

2014

ZAKLJUČNA NALOGA

MARKEŽIČ

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

ZAKLJUČNA NALOGA  
AKUTNO FAZNI ODGOVOR  
IN VPLIV SERUMSKEGA AMILOIDA A1  
PRI VNETJU IN INFEKCIJAH IZ VIDIKA  
STRUKTURNIH IN FUNKCIJSKIH  
LASTNOSTI

KRISTINA MARKEŽIČ

UNIVERZA NA PRIMORSKEM  
FAKULTETA ZA MATEMATIKO, NARAVOSLOVJE IN  
INFORMACIJSKE TEHNOLOGIJE

Zaključna naloga

**Akutno fazni odgovor in vpliv serumskega amiloida A1 pri vnetju in  
infekcijah iz vidika strukturnih in funkcijskih lastnosti**

(Acute phase response and the influence of serum amyloid A1 in inflammation and infections  
from the perspective of structural and functional properties)

Ime in priimek: Kristina Markežič

Študijski program: Bioinformatika

Mentor: doc. dr. Snežna Sodin Šemrl

Koper, avgust 2014

## Ključna dokumentacijska informacija

Ime in PRIIMEK: Kristina MARKEŽIČ

Naslov zaključne naloge: Akutno fazni odgovor in vpliv serumskega amiloida A1 pri vnetju in infekcijah iz vidika strukturnih in funkcijskih lastnosti

Kraj: Koper

Leto: 2014

Število listov: 84      Število slik: 22      Število tabel: 4

Število referenc: 42

Mentor: doc. dr. Snežna Sodin Šemrl

Ključne besede: Serumski amiloid A1, SAA1, akutna faza, odziv akutne faze, vnetje, infekcije

Izvleček: Serumski amiloid A1 (SAA1) je akutno fazni protein in odličen pokazatelj vnetja pri ljudeh. Med akutno fazo se lahko nivoji SAA1 v cirkulaciji povišajo tudi do 1000-krat. V glavnem je proizveden v jetrih, vendar tudi ekstrahepatično in njegovo delovanje regulirajo vnetni citokini. SAA1 je evolucijsko ohranjen protein, katerega glavna funkcija je še neznana. Pri določenih koncentracijah deluje tudi proti infekcijam nekaterih bakterij in virusov. Pri višjih koncentracijah lahko privede do kroničnosti bolezni. Glavni namen diplomske naloge je raziskati vlogo akutno-faznega odgovora ter vlogo SAA1 v vnetju in infekcijah, ter z bioinformatičnimi podatkovnimi bazami in orodji opredeliti molekularno strukturo SAA1 na genskem, RNA in proteinskem nivoju ter preveriti, če se iz strukture SAA1 lahko predvideva potencialne funkcije. Naloga je fokusirana na povezovanju javno dostopnih ter pridobljenih informacijah z bioinformatičnimi orodji. Dodano vrednost naloge predstavlja nova interpretacija potencialnih funkcij SAA1.

## Key words documentation

Name and SURNAME: Kristina MARKEŽIČ

Title of the final project paper: Acute phase response and the influence of serum amyloid A1 in inflammation and infections from the perspective of structural and functional properties

Place: Koper

Year: 2014

Number of pages: 84

Number of figures: 22

Number of tables: 4

Number of references: 42

Mentor: Assist. Prof. Snežna Sodin Šemrl, PhD

Keywords: Serum amyloid A1, SAA1, acute phase, acute phase response, inflammation, infection

Abstract: Serum amyloid A1 (SAA1) is an acute phase protein and an excellent indicator of inflammation in humans. During the acute phase, SAA1 circulating levels can increase up to 1000-times. It is mainly produced in the liver, but can also be of extrahepatic origin and its operation is regulated by inflammatory cytokines. SAA1 is an evolutionarily conserved protein whose main function is still unknown. In certain concentrations, it also works against infections of some bacteria and viruses. At higher concentrations can lead to chronic disease. The main purpose of the thesis is to explore the role of the acute-phase response and the role of SAA1 in inflammation and infections, and with the use of bioinformatical databases and tools to identify the molecular structure of SAA1 on the gene, RNA and protein level and verify if the structure of SAA1 may indicate some potential functions. The focus is on the integration of publicly available informations and informations obtained from bioinformatic tools. This thesis represents a new interpretation of SAA1 potential functions.

## **ZAHVALA**

Zahvalila bi se svoji mentorici doc. dr. Snežna Sodin Šemrl za strokovno pomoč in podporo pri nastajanju diplomskega dela.

## Kazalo vsebine

1	UVOD.....	1
1.1	Reakcija akutne faze .....	1
1.1.1	Drugi odzivi akutne faze .....	3
1.1.2	Domnevna funkcija akutno faznega odziva .....	4
1.1.3	SAA, kot eden glavnih akutno faznih proteinov .....	5
1.1.3.1	Časovni potek sprememb koncentracije SAA, ki lahko vodijo do kroničnosti bolezni .....	6
1.1.4	Klinična ocena proteinov akutne faze .....	7
1.2	SAA kot pomembna komponenta obrambnega mehanizma gostitelja pred virusnimi, bakterijskimi in glivičnimi okužbami .....	8
2	NAMEN .....	10
3	METODE.....	11
3.1	Bioinformatični portali .....	11
3.1.1	NCBI portal (National Center for Biotechnology Information) .....	11
3.1.2	ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal .....	12
3.2	Bioinformatične podatkovne baze .....	14
3.2.1	PubMed, podatkovna baza literature (NCBI) .....	14
3.2.2	Referenčne sekvence (NCBI) .....	14
3.2.3	Sekvence iz GenBank in drugih virov (NCBI) .....	15
3.2.4	Entrez PubMed (NCBI) .....	15
3.2.5	Gene (NCBI) .....	16
3.2.6	GeneCards .....	16
3.2.7	UniProt-GO Annotation database .....	16
3.2.8	KEGG .....	17
3.2.9	HUGO Gene Nomenclature Committee .....	18
3.2.10	OMIM .....	18
3.3	Bioinformatična orodja .....	22
3.3.1	NCBI BLAST: Basic Local Alignment Search Tool .....	22
3.3.2	GORIV .....	23
3.3.3	PSIPRED.....	24
3.3.4	Porter.....	25
3.3.5	TargetP .....	25
3.3.6	SOSUI .....	26
4	REZULTATI .....	29
4.1	Centralna dogma molekularne biologije.....	30
4.2	Referenčna sekvenca gena SAA1 na kromosomu 11 .....	32
4.2.1	Lokalizacija gena SAA1 na lokusu 11p15.1 ter okoliški geni.....	35
4.2.1.1	SAA1 .....	36
4.2.1.2	GTF2H1 .....	36
4.2.1.3	HPS5.....	36
4.2.1.4	ST13P5 .....	37
4.3	Gen SAA1.....	37
4.4	SAA1 mRNA.....	39

4.4.1	Primerjava treh transkripcijskih variant humane mRNA SAA1 .....	39
4.5	Primarna proteinska struktura.....	41
4.5.1	Tri različice primarne proteinske strukture in njihova medsebojna primerjava.....	42
4.5.2	Primarna proteinska struktura, pridobljena iz sekvenc NG_021330 in M23698	42
4.5.2.1	NG_021330 .....	42
4.5.2.2	M23698 .....	42
4.5.3	Primarna proteinska struktura, pridobljena iz AAA64799 .....	43
4.6	Sekundarna proteinska struktura.....	43
4.6.1	Metoda GORIV .....	44
4.6.2	PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench.....	45
4.6.3	PORTER .....	46
4.7	Terciarna proteinska struktura .....	48
4.8	Ontologija gena.....	50
4.8.1	Interakcije SAA1 z drugimi proteini.....	50
4.8.2	Vključenost SAA1 v različne fiziološke procese.....	52
4.8.3	Izvor in lokalizacija SAA1.....	52
4.8.3.1	TargetP.....	53
4.8.3.2	SOSUI .....	54
5	RAZPRAVA.....	55
5.1	Regulacija akutno faznih sprememb.....	55
5.1.1	Indukcija proteinov akutne faze s strani citokinov in drugih zunajceličnih molekul	55
5.1.2	Regulacija genov akutno-faznega Seruma amiloida A s strani dejavnika tumorske nekroze $\alpha$ , interleukina-6 in glukokortikoidov v človeških jetrnih in epitelijskih celičnih linijah.....	57
5.1.3	Regulacija drugih akutnih sprememb s strani vnetnih citokinov.....	60
5.2	Serumski amiloid A aktivno sodeluje pri zaviranju vstopa virusa hepatitisa C v sistemu celične kulture .....	61
5.3	Serum amiloid A se veže na protein A zunanje membrane Gram-negativnih bakterij in deluje kot prirojen imunski opsonin.....	62
5.4	Serumski amiloid kot aktivator protimikrobnih funkcij: indukcija degranulacije, fagocitoze in krepitve obrambe proti <i>Candida albicans</i> .....	66
6	ZAKLJUČEK .....	67
7	LITERATURA IN VIRI .....	68

## Kazalo slik

Slika 1: Značilni vzorci sprememb plazemske koncentracije nekaterih proteinov akutne faze po vnetnem dražljaju.....	2
Slika 2: Prikaz centralne dogme molekularne biologije.....	31
Slika 3: Lociranje SAA1 gena na kromosomu in drugi okoliški geni.....	32
Slika 4: Genska sekvenca SAA1 .....	35
Slika 5: Kromosom 11 in lokacija gena SAA1 .....	37
Slika 6: Primarni transkript .....	39
Slika 7: mRNA, ki sestavlja kodirajočo sekvenco .....	39
Slika 8: Transkripcijska varianta 1 .....	40
Slika 9: Transkripcijska varianta 2 .....	40
Slika 10: Transkripcijska varianta 3 .....	40
Slika 11: Primerjava humane mRNA SAA1 .....	41
Slika 12: Spremembe v nukleotidnem zaporedju sekvenc .....	43
Slika 13: Primarna proteinska struktura SAA1 .....	43
Slika 14: Napoved sekundarne proteinske strukture z metodo GORIV.....	45
Slika 15: Napoved sekundarne proteinske strukture z metodo PSIPRED .....	45
Slika 16: Napoved sekundarne proteinske strukture z metodo Porter.....	46
Slika 17: Terciarna proteinska struktura proteina SAA1 .....	48
Slika 18: Monomerna struktura SAA1 .....	50
Slika 19: Sistemski, imunski in vnetni odziv.....	52
Slika 20: Analiza primarne proteinske strukture proteina SAA1 z uporabo orodja TargetP .....	53
Slika 21: Analiza primarne proteinske strukture proteina SAA1 z uporabo orodja SOSUI .....	54
Slika 22: Shema okvirnega prikaza poteka regulacije proteinske ekspresije SAA1 .....	60



## **Kazalo tabel**

Tabela 1: Pregled in kratek opis portalov in njihovih internetnih strani .....	13
Tabela 2: Pregled in kratek opis podatkovnih baz in njihovih internetnih strani .....	19
Tabela 3: Pregled in kratek opis bioinformatičnih orodij in njihovih internetnih strani .....	27
Tabela 4: Tabela primerjav treh proteinskih struktur.....	42

## OKRAJŠAVE

2D-PAGE - dvodimenzionalna poliakrilamidna gelska elektroforeza

APR – akutno fazni odziv

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

CDART - Conserved Domain Architecture Retrieval Tool

CDD - Conserved Domain Database

cDNA ali cDNK - komplementarna DNA

CDS - kodirajoče zaporedje

COL4A1 - kolagen tipa IV, alpha 1

COL4A2 - kolagen tipa IV, alpha 2

COL4A3 - kolagen tipa IV, alpha 3

COL4A4 - kolagen tipa IV, alpha 4

CRP - C-reaktivni protein

DNA ali DNK - deoksiribonukleinska kislina

EBI - Evropski inštitut za bioinformatiko

ELISA - encimskoimunski test

ER - endoplazemski retikulum

EST - Expressed Sequence Tag

ExPASy - Expert Protein Analysis System

FPRL-1/ALX – z G proteinom sklopljen lipoksinski receptor

GEO - Gene Expression Omnibus

GOA – Gene Ontology Annotations

GSS - Genome Survey Sequence

GTF2H1 – General transcription factor IIIH, polypeptide 1

HDL - lipoprotein visoke gostote

HepG2 - celice hepatocelularnega karcinoma

HGNC - HUGO Gene Nomenclature Committee

HIV-1 - humani imunodeficientni virus tipa 1

HPS5 - Hermansky-Pudlak Syndrome 5

IL-1 – interleukin-1

IL-6 - interlevkin-6

IL-1 $\beta$  - interlevkin-1 $\beta$

IL-8 - interlevkin-8

IL-10 - interlevkin-10

INSDC - International Nucleotide Sequence Database Collaboration

KB – tip tumorskih epiteljskih celic

KEGG - Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes

LAMA1 – laminin, alpha 1

LDL - lipoprotein majhne gostote

mRNA ali mRNK – messenger RNA ali informacijska ribonukleinska kislina

MMDB - Molecular Modeling Database

NCBI - National Center for Biotechnology Information

NF- $\kappa$ B - transkripcijski faktor jedrnega faktorja –  $\kappa$ B

OMIA - Online Mendelian Inheritance in Animals

OMIM - Online Mendelian Inheritance in Man

OmpA - protein zunanje membrane A

PMC - PubMed Central

PMN - polimorfonuklearne celice

RA - revmatoidni artritis

RefSeq – Reference Sequence ali referenčne sekvence

RNA ali RNK - ribonukleinska kislina

rSAA - rekombinantni SAA

SAA - Serumski amiloid A

SAA1 - Serumski amiloid A1

SAA2 - Serumski amiloid A2

SAA3 - Serumski amiloid A3

SAA4 - Serumski amiloid A4

SDS-PAGE - poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata

SIB - švicarski inštitut za bioinformatiko

ST13P5 - Suppression Of Tumorigenicity 13 (Colon Carcinoma) (Hsp70 Interacting Protein) Pseudogen 5

TNF- $\alpha$  - dejavnik tumorske nekroze -  $\alpha$

UPEC - sevi uropatogene *Escherichia coli*

UTIs - okužbe sečil

UTR - neprevedena regija na vsakem koncu mRNA

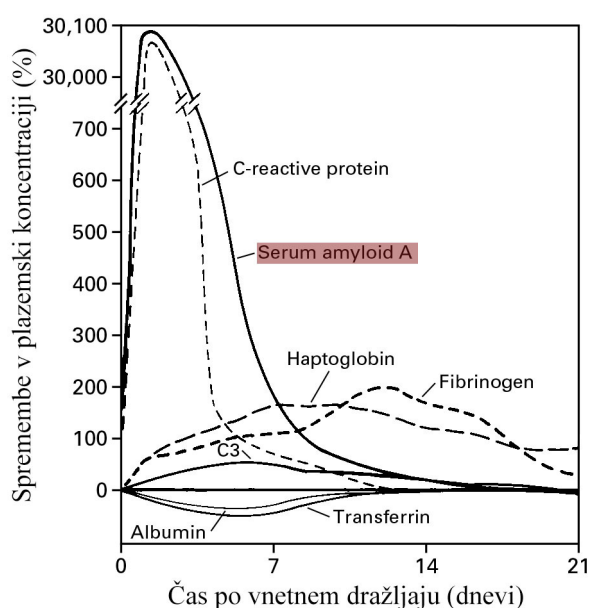
VHC ali HCV - virus hepatitisa C

VIMP - Selenoprotein S ali VCP-Interacting Membrane Protein

# 1 UVOD

## 1.1 Reakcija akutne faze

Izraz "akutna faza" je bil sprva uporabljen v povezavi s serumom akutno bolnega bolnika, okuženim z nalezljivo boleznijo. Danes se šteje, da ta termin vključuje širok obseg postopkov in mehanizmov, sestavljenih iz nevroendokrinih, krvotvornih, presnovnih in jetrnih sprememb, kakor tudi raznih modulacijah v neproteinskih plazemskih sestavinah [21]. Spremembe akutne faze delimo na spremembe v koncentraciji številnih plazemskih proteinov, znanih kot proteini akutne faze, in na številne vedenjske, fiziološke, biokemijske in prehranske spremembe (to so drugi pojavi akutne faze) [11]. Sprožitev okoljskih dejavnikov, kot so bakterije, virusi, poškodbe in celjenje ran, avtoimunost, novotvorbe v kombinaciji s stresom, sistemsko in celično staranje, povzročijo akutno fazni odziv (APR) [21]. To je niz vnetnih reakcij na okužbe, poškodbe in poškodbe tkiva zaradi gostitelja. Cilji tega odziva so večstranski - po eni strani izolirajo, nevtralizirajo in očistijo organizem patogenih organizmov, preprečujejo nadaljnji vnos patogenov in zmanjšujejo poškodbe tkiva, po drugi strani pa spodbujajo k resoluciji vnetja, celjenju ran, in na koncu, ponovno normalizirajo fiziološke funkcije, oziroma vzpostavijo homeostazo [20]. Organizem reagira na prekinjeno homeostazo s pritokom lokalnih celic, katere so vključene v vnetja (to so polimorfonuklearni levkociti, monociti, makrofagi, limfociti), z izločanjem številnih citokinov (predvsem interleukina IL-1, IL-6 in dejavnika tumorske nekroze -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) in kemokinov (kot je IL-8) v krvni obtok. To stimulira nastajanje akutno faznih proteinov v jetrih in izločanje le-teh v krvni obtok, kar predstavlja akutno fazni odziv (Slika 1).



Slika 1: Značilni vzorci sprememb plazemske koncentracije nekaterih proteinov akutne faze po vnetnem dražljaju. (Reproduced with permission from Gabay and Kushner, 1999, The New England Journal of Medicine, Copyright Massachusetts Medical Society).

Razvoj tega odziva pripelje, med drugim, do celjenja ran, bakterijskega in virusnega čiščenja, odstranjevanja antigenih - avtoprotitelesnih kompleksov, razgradnji in odstranjevanju celičnih ostankov, na koncu pa se koncentracije akutno faznih proteinov povrnejo v začetno stanje. Proteini, katerih koncentracija se lahko med akutno faznim odzivom v krvi spremeni za več kot 25%, spadajo med glavne proteine akutne faze [21]. Beljakovine akutne faze so opredeljene kot tiste, katerih se pri vnetnih obolenjih koncentracija zviša (pozitivne beljakovine akutne faze) ali zmanjša (negativne beljakovine akutne faze) za vsaj 25 odstotkov [11]. Dokazano je, da akutno fazni proteini igrajo vlogo pri vnetju, prirojeni odpornosti, kot tudi pri apoptozi [20]. Spremembe v koncentracijah proteinov akutne faze nastanejo predvsem zaradi sprememb v njihovi proizvodnji s strani hepatocitov [11]. Pri ljudeh sta taka proteina C-reaktivni protein (CRP) in serumski amiloid A (SAA), saj se lahko njihova koncentracija, ki se začne dvigovati približno 4 ure po začetnem dražljaju (npr. infekciji), poveča do 1000x [21]. To znatno povečanje koncentracij obeh proteinov se pokaže v roku 24 ur, kot odgovor na sistemske okužbe [34]. Kljub vsemu pa je SAA zelo pogosto občutljivejši in optimalnejši vnetni marker v primerjavi s CRP [20]. Okužbe, poškodbe, operacije, opekline, nekroza tkiva ter napredovali rak pogosto vodijo do bistvenih sprememb plazemskih koncentracij proteinov akutne faze. Do zmernih sprememb pride po naporni vadbi, toplotnem udaru ter porodu.

Do majhnih sprememb pa pride po psihološkem stresu in pri številnih psihiatričnih boleznih. Čeprav se koncentracije številnih komponent odgovora akutne faze običajno povečajo hkrati, se ne povečajo vse enakomerno pri vseh bolnikih z isto boleznijo. Torej vročinski bolniki lahko imajo normalne koncentracije C-reaktivnega proteina v plazmi, značilna pa je neusklajenost med koncentracijami različnih drugih beljakovin akutne faze. Te razlike kažejo, da so posamezni sestavni deli akutne reakcije posebej regulirani, kar je deloma mogoče razložiti z razlikami v vzorcih proizvodnje specifičnih citokinov ali njihovih modulatorjev v različnih patofizioloških stanjih [11].

### 1.1.1 Drugi odzivi akutne faze

Naštete nevroendokrine, krvotvorne, metabolne in jetrne spremembe ter spremembe v ne-proteinskih plazemskih komponentah so povzete po Gabay and Kushner, 1999 [11]. Opisujejo različne odzive organizma, ki so lahko prisotne ob akutno faznem odgovoru.

#### 1. Nevroendokrine spremembe:

- a)* vročina, zaspanost in anoreksija,
- b)* povečano izločanje kortikotropin-sproščujočega hormona, kortikotropina in kortizola,
- c)* povečano izločanje arginin-vazopresina,
- d)* zmanjšanje v proizvodnji inzulina podobnega rastnega faktorja,
- e)* povečano izločanje kateholaminov iz nadledvične žleze.

#### 2. Krvotvorne spremembe:

- a)* anemija zaradi kronične bolezni,
- b)* levkocitoza,
- c)* trombocitoza.

#### 3. Metabolne spremembe:

- a)* izguba mišic in negativna dušikova bilanca,
- b)* zmanjšana glukoneogeneza,
- c)* osteoporoza,

- d)* pospešena jetrna lipogeneza,
- e)* povečana lipoliza v maščobnem tkivu,
- f)* zmanjšana aktivnost lipoproteinske lipaze mišičnega in maščobnega tkiva,
- g)* kaheksija.

#### 4. Jetrne spremembe:

- a)* zvišana količina metalotioneinov, inducibilnost sintaze dušikovega oksida, heme oksidaze, mangan superoksid dismutaze ter inhibitorja tkiva metaloproteinaze-1
- b)* zmanjšana dejavnost fosfoenolpiruvatne karboksikinaze.

#### 5. Spremembe v ne-proteinskih plazemskih komponentah:

- a)* pomanjkanje cinka in železa ter povišane koncentracije bakra v telesu,
- b)* povišane plazemske koncentracije retinola in glutationa.

### 1.1.2 Domnevna funkcija akutno faznega odziva

Predpostavka, da so spremembe plazemskih koncentracij proteinov med akutno fazo koristne, v veliki meri temelji na že znanih funkcionalnih sposobnostih beljakovin in na logični domnevi, kako bi lahko proteini služili v koristne namene pri vnetju, zdravljenju ali prilagoditvi na škodljiv dražljaj. Vnetje je zapleten, zelo orkestriran proces, ki vključuje številne vrste celic in molekul, od katerih nekatere sprožijo, ojačajo ali ohranijo proces, druge pa proces oslabijo tretje pa pripeljejo do razrešitve samega procesa. Več sodelujočih molekul je multifunkcijskih in prispevajo tako pri krepitvi kot pri pojojanju vnetja na različnih točkah njegovega razvoja. Veliko proteinov akutne faze potencialno lahko vpliva na eno ali več faz vnetja. Delovanje enega izmed glavnih proteinov akutne faze pri človeku, serumskega amiloida A (SAA), je večinoma neznano. SAA sestoji iz družine apolipoproteinov, ki se po njihovi sintezi hitro vežejo na lipoprotein visoke gostote (HDL, oziroma „dobri“ holesterol) in vplivajo na presnovo holesterola med vnetnimi stanji. Ugotovljeno je bilo, da SAA povzroča oprijemljivost in kemotakso fagocitnih celic in limfocitov in lahko prispeva k vnetju koronarnih arterij pri aterosklerozi, s povečanjem oksidacije lipoproteinov majhne gostote (LDL). Številni proteini akutne faze lahko tudi



sprožijo ali ohranjajo vnetje. Elementi klasičnega sistema komplementa, med katerimi spada mnogo proteinov akutne faze, imajo centralno vnetno vlogo pri odpornosti. Aktivacija komplementa vodi v kemotakso, eksudacijo plazemskih beljakovin v vnetno mesto in opsonizacijo infektov in poškodovanih celic. V nasprotju s tem, imajo lahko drugi akutni proteini protivnetno delovanje. O koristnih učinkih drugih akutno faznih pojavov lahko ugibamo. Zaspanost, povezana z vnetnimi stanji, lahko zniža povpraševanje po energiji. Adaptivna vrednost vročine je bila pripisana tako krepitvi odpornosti, kot stabilizaciji celične membrane. Glukokortikoidi imajo pomembno vlogo pri vzdrževanju hemodinamske stabilnosti v času hude bolezni in lahko uravnavajo delovanje imunskih in vnetnih odzivov na različne škodljive dražljaje. Povečanje koncentracije lipidov v plazmi lahko zagotovi hranila celicam, ki sodelujejo pri obrambi gostitelja, in substratov za regeneracijo poškodovanih membran. Poleg tega lahko lipoproteini v obtoku sodelujejo pri obrambi pred mikrobi tako, da se vežejo na lipopolisaharide in s tem zmanjšujejo njihove toksične učinke. Spremembe v jetrih lahko vplivajo tako, da omejijo oksidacijsko posredovane poškodbe tkiva, medtem ko po drugi strani antagonistično zmanjšujejo učinke metaloproteinaz. Kot pri vseh vnetno povezanih pojavih, akutna reakcija ni vedno popolnoma koristna. Slabokrvnost in motnje rasti so lahko ene izmed škodljivih posledic. Ekstremne spremembe, ki jih povzročijo citokini, povezani z akutno reakcijo, lahko postanejo usodne, ter lahko vodijo v septični šok. Poleg tega, vztrajnost akutne reakcije zaradi dolgotrajne stimulacije, kot pri napredovalem raku in sindromu pridobljene imunske pomanjkljivosti, lahko privede do motenj metabolizma, ki se konča v kaheksiji. Nazadnje je sekundarna amiloidoza dolgo priznana kot posledica škodljivega zvišanja koncentracije SAA pri nekaterih bolnikih s kroničnim vnetjem [11].

### **1.1.3 SAA, kot eden glavnih akutno faznih proteinov**

Serum amiloid A (SAA) in ostale beljakovine iz iste družine so akutno fazni proteini, katerih koncentracija v krvi se močno poviša med akutnim vnetjem. Družina proteinov SAA vsebuje štiri člane, SAA1, SAA2, SAA3 in SAA4. Med številnimi različnimi vlogami, ki jih igra SAA, so najpomembnejše regulacija mehanizmov za boj proti poškodbam, zdravljenje infekcij in vzpostavitev homeostaze. V obtoku je SAA v glavnem povezan z visoko gostoto lipoproteinov, lahko vpliva na transport holesterola in je vpleten

v patogenezo ateroskleroze, revmatoidnega artritisa (RA) in raka. Odlaganje razkrojenega proteina SAA lahko privede do sistemske reaktivne AA amiloidoze. SAA je eden od najpomembnejših pozitivno odzivajočih se proteinov akutne faze tako pri ljudeh, kot pri večini živali, in njegove vrednosti se uporablja kot laboratorijski parameter pri diagnostiki vnetnih bolezni, ugotavljanju ustreznjšega načina zdravljenja, prognostiki in napovedovanju izida zdravljenja. SAA je močno evolucijsko ohranjen (v razponu od nevretenčarjev do človeka), glede na zaporedje in induktivno zmogljivost, kar dokazuje, da so njegove funkcije ključnega biološkega pomena. Njegova genska družina se pri ljudeh nahaja na kromosomu 11p15.1. Vsi SAA geni so sestavljeni iz štirih eksonov in treh intronov (prvi ekson vsebuje samo nekodirajoče regije) [20].

#### 1.1.3.1 Časovni potek sprememb koncentracije SAA, ki lahko vodijo do kroničnosti bolezni

Sprožitev zunanjih dogodkov ali „hitov“ (kot so poškodbe, okužbe in / ali sterilna vnetja) lahko privede v roku približno 24h do povišanih koncentracij glavnih akutno faznih proteinov, kot je SAA, v krvnem obtoku. Sledi popravljalni mehanizem resolucij (ki ponavadi traja 7 dni) v katerem se akutno fazni odziv SAA postopno vrne na fiziološke, izhodiščne koncentracije. Med resolucijo najverjetneje poteka, med drugimi postopki, čiščenje celičnih razkrojev, opsonizacija in odprava velikih količin SAA. Obstajajo številne predpostavke o tem, kako ta zapleten proces poteka. Nekatere raziskave so nakazale, da so v procesu lahko vpletena protitelesa SAA v vezavo in čiščenje množične količine SAA. Ta avtoprotitelesa lahko delujejo kot naravna protitelesa, ki sodelujejo pri homeostazi. Kadarkoli pride v kratkem časovnem razponu (ali nepretrgoma v daljšem časovnem obdobju) do več „hitov“ hkrati, je okrevanje organizma in hkrati vzpostavitev homeostaze onemogočeno. Za čas celotnega življenjskega obdobja nekega organizma (s starostjo in senescenco) je zmožnost vzpostavitve akutno faznega odziva, kakor tudi povrnitve homeostaze, oslABLJena oziroma zmanjšana. Pri zdravih posameznikih lahko več „hitov“ privede do manj vidnega akutno faznega odziva, in pri nekaterih nagnjenih posameznikih lahko več „hitov“ vodi do kronično spremenjenih akutno faznih proteinov. V odsotnosti faze resolucije, bi lahko prišlo do "domino učinka", saj bi akutno fazni proteini izvajali dolgoročne razgradne učinke, še posebej poškodbe tkiva in organov [21]. Med kroničnimi vnetji nivoji SAA ostajajo še naprej povišani, kar odraža nenehno vztrajnost osnovnih

patoloških vnetnih procesov, ki lahko prispevajo k dolgoročni poškodbi tkiva. Posledica nezdravljenih kroničnih vnetij je lahko reaktivna sekundarna amiloidoza, pri kateri je amiloidni protein (AA), produkt razkroja SAA, glavna sestavina netopnih depozitov vlaknin, ki se akumulirajo v glavnih organih. Dokazano je, da SAA, v vlogi povzročitelja, aktivno sodeluje pri boleznih, kot so bolezni srca, avtoimunske bolezni, rak, amiloidoza, in ne služi le kot njihov prognostični označevalec. Študije so pokazale, da je mogoče predvideti nagnjenost k razvoju amiloidoze s preučevanjem polimorfizmov pri C-13T v zgornjem območju ter C2995T in T3010C v regiji tretjega eksona SAA1 gena [20].

#### **1.1.4 Klinična ocena proteinov akutne faze**

Tako anemija kot hipoalbuminemia sta pogosti posledici vnetja hospitaliziranih bolnikov. Ocena drugih sprememb akutno faznih proteinov, kljub pomanjkanju diagnostične specifičnosti, je koristna zdravnikom, saj te spremembe odražajo prisotnost in intenzivnost vnetnega procesa. Trenutno sta najbolj pogosto uporabljena kazalnika vnetja sedimentacija eritrocitov (s kakšno stopnjo se eritrociti spuščajo skozi plazmo) in plazemska koncentracija C-reaktivnega proteina (CRP). Koncentracija SAA je običajno vzporedna s koncentracijo C-reaktivnega proteina, čeprav nekatere študije kažejo, da je SAA bolj občutljiv označevalec vnetne bolezni [11]. Identifikacija neinvazivnih označevalcev akutnih celičnih zavrnitev ima pomembne posledice pri upravljanju z imunosupresijo pri transplantacijah. Odkritje koncentracije vsaj enega proteina, kateri kaže na akutno celično zavrnitev v vzorcu, in s primerjavo ravni proteina v vzorcu s kontrolo skupino, sta lahko koristna procesa za zaznavanje morebitnega zavračanja transplantata. Razlika se lahko kaže v povečanju ali zmanjšanju vsebnosti proteina, v primerjavi s kontrolo. Človeški SAA1 je na seznamu proteinov, katerih koncentracija se poveča [20]. Koncentracijske ravni SAA so povečane pri pogojih, povezanih s povečanim kardiovaskularnim tveganjem, vključene v debelost, inzulinske rezistence, metabolični sindrom, diabetes in revmatoidni artritis. Iz tega sledi, da so lahko tudi kronično zmerno zvišane koncentracijske ravni SAA povezane s povečanim tveganjem za bolezni srca in ožilja. Čeprav so potrebne dodatne študije, te ugotovitve nakazujejo na možnost, da bi lahko SAA služil kot pokazatelj za povečano tveganje bolezni srca in ožilja [6].

## 1.2 SAA kot pomembna komponenta obrambnega mehanizma gostitelja pred virusnimi, bakterijskimi in glivičnimi okužbami

Družino SAA beljakovin najdemo pri sesalcih in drugih vretenčarjih, kot so vrečarji in ribe, vendar tudi v bolj antičnih virih, kot je morska kumara, iglokožec, kjer je izražen v celomskem epitelu in se sproži kot odziv na lipopolisaharide. Dve glavni obliki proteina akutne faze SAA (SAA1 in SAA2) se v veliki meri sintetizirata v hepatocitih. Med hudim vnetjem, se lahko koncentracija v plazmi tega akutno faznega proteina poveča od 1 do 5 µg/mL, včasih pa celo na 1 mg/mL, in takrat lahko SAA obsega več kot 2% celotne sinteze proteinov v jetrih. Tretji genski produkt, SAA3, se v veliki meri sintetizira v ekstrahepatičnih (zunaj jetrnih) območjih in je enako sprožen s strani vnetnih citokinov, kot so interleukin-6 in IL-1. Konstitutivna oblika (SAA4) ima vložek (insert) osmih aminokislin in zajema najbolj obilno obliko SAA v serumu pri zdravih posameznikih. V odsotnosti vnetja, glavna območja sinteze SAA vključujejo epitelij [34]. Visoko povišanje koncentracije SAA med odzivom akutne faze kažejo, da je SAA je pomembna komponenta obrambnega mehanizma gostitelja in ugotovljeno je bilo, da ima koristne lastnosti pri zaščiti pred glivičnimi, virusnimi in bakterijskimi okužbami in lahko pomaga zmanjšati pogostost ponavljajočih okužb. Koncentracije proteina SAA so višje pri bakterijskih okužbah kot pa pri virusnih infekcijah, čeprav kaže, da je SAA klinično pomembnejši kot marker vnetja pri akutnih virusnih infekcijah. V planarnih lipidnih dvoslojih se lahko SAA sestavi v heksametrične strukture, kjer vsaka vsebuje osrednji kanal (s premerom 2,5 nm) in ima potencial, da poškoduje bakterijske membrane [10].

Alternativne študije so raziskale neposredne učinke SAA na številne imunske celice [16]. Dokazano je bilo, da se SAA veže na različne tipe celic, vključno s trombociti in limfociti [34]. SAA povzroča kemotakso in aktiviranje različnih tipov celic, vendar HDL lahko ovira te odgovore. Vprašanje je, ali se to zgodi tudi *in vivo*. SAA sproži tudi številne druge celične odzive, tudi za proizvodnjo kolagenaze. Prej opisane vezivne lastnosti vključujejo interakcijo z več tipi celic, kot tudi vezava na ekstracelularni matriks glikoproteinov [16].

Rekombinantni SAA lahko poveča proti-glivične aktivnosti polimorfonuklearnih celic (PMN). V 30 minutah stimulacije, SAA spodbuja uravnavanje citosolnih koncentracij  $Ca^{++}$  izražanje antigenov na površini celic, vključenih pri adheziji in prepoznavanju mikrobov

(CD11C in CD16), in zvišanje izločanja laktoferina. Laktoferin sam je protimikrobno sredstvo, ki krepi fagocitno aktivnost polimorfonuklearnih celic proti vročinsko ubitim kvasovkam *Candida albicans*. SAA reagira tudi z virusom hepatitisa C, s čimer blokira vstop virusa. SAA je tudi eden od prvih sistemskih protivirusnih odzivov na HIV-1, induciranim 5-7 dni pred prvim odkritjem virusne RNA v plazmi in bistveno prej kot drugi sistemski citokini. Takšna opazovanja kažejo, da SAA deluje v prvi vrsti pri protivirusni obrambi, celo pred sistemskim aktiviranjem drugih imunskih odzivov [10].

## 2 NAMEN

Serumski amiloid A1 (SAA1) je akutno fazni protein in odličen pokazatelj vnetja pri ljudeh. Med akutno fazo se SAA1 nivoji v cirkulaciji lahko povišajo tudi do 1000-krat. V glavnem je proizveden v jetrih, vendar tudi ekstrahepatično in njegovo delovanje regulirajo vnetni citokini. SAA1 je evolucijsko ohranjen protein, katerega glavna funkcija je še neznana. Nakazano je, da pri nizkih koncentracijah deluje anti-infektivno, medtem ko pri višjih koncentracijah lahko vpliva patološko, trajno zvišan pa lahko privede do kroničnih bolezni.

Glavni namen diplomske naloge je raziskati vlogo akutno-faznega odgovora in vlogo SAA1 v vnetju in pri infekcijah ter z bioinformatičnimi podatkovnimi bazami in orodji opredeliti molekularno strukturo SAA1 na genskem, RNA in proteinskem nivoju ter preveriti, če se iz strukture SAA1 lahko predvideva potencialne funkcije z uporabo bioinformatičnih portalov, orodij in databaz, ki bi lahko vplivale na akutno fazo, infekcije in/ali vnetje.

Specifični cilji so:

1. Opredeliti vlogo akutno-faznega odgovora pri vnetjih in infekcijah
2. Določiti vlogo SAA1 v akutni fazi
3. Določiti kromosomsko lokalizacijo, strukturo SAA1 gena ter mRNA sekvenco SAA1
4. Opredeliti primarno, sekundarno in terciarno strukturo SAA1 proteina
5. Nakazati možne funkcije SAA1 iz strukturnih opredelitev ter proteinskih interakcij

### 3 METODE

#### 3.1 Bioinformatični portali

##### 3.1.1 NCBI portal (National Center for Biotechnology Information)

Poleg ohranjanja zaporedij nukleinskih kislin v podatkovni bazi GenBank, Nacionalni center za biotehnoške informacije (angl. National Center for Biotechnology Information, ali NCBI) zagotavlja analizne metode in sredstva za priklic podatkov iz GenBank in drugih bioloških podatkov, ki so na voljo preko spletne strani NCBI. NCBI vključuje različne povezave na orodja ali podatkovne databaze kot so: Entrez, Entrez Programming Utilities, MyNCBI, PubMed, PubMed Central (PMC), Gene, NCBI Taxonomy Browser, BLAST, BLAST Link (Blink), Primer-BLAST, COBALT, Splign, RefSeq, UniGene, HomoloGene, ProtEST, dbMHC, dbSNP, dbVar, Epigenomics, Genome in z njim povezana orodja, Map Viewer, Model Maker, Evidence Viewer, Trace Archive, Sequence Read Archive, BioProject, BioSample, Retroviral Genotyping Tools, HIV-1/ Human Protein Interaction Database, Gene Expression Omnibus (GEO), Probe, Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA), Molecular Modeling Database (MMDB), Conserved Domain Database (CDD), Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (CDART), Biosystems, Protein Clusters in PubChem, zbirko majhnih molekularnih podatkovnih baz. Vsi ti viri so dostopni preko domače strani NCBI na: [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov). NCBI je bil ustanovljen leta 1988 za razvoj informacijskih sistemov molekularne biologije. Vodnik NCBI strani (NCBI Guide) ne služi le kot domača stran, ampak tudi kot interaktivni direktorij te spletne strani. Na glavni strani vodnika NCBI so v spustnem meniju, ki se nahaja v standardni glavi, kategorije virov, ki so podane tudi na seznamu na levi strani. S klikom na katero koli kategorijo se prikaže seznam ustreznih virov, razvrščenih v štiri skupine: baze podatkov, prenos, prispevki in orodja. Pomoč na straneh je na voljo tudi prek zavihka "How-To". Priljubljeni viri so navedeni na desni strani pod naslovom s "Quick Links" (hitre povezave) in na glavni strani je seznam najbolj pogosto uporabljenih virov [32].

NCBI pridobiva podatke iz treh virov [32]:

- neposredni prispevki zunanjih raziskovalcev
- sodelovanja ali dogovori, tako nacionalni kot mednarodni, z dajalci podatkov in

raziskovalnimi konzorciji

- notranja prizadevanja za ohranjanje.

### 3.1.2 ExPASy: SIB Bioinformatics Resource Portal

ExPASy (Expert Protein Analysis System) je spletna stran (<http://www.expasy.org>), ki je na voljo kot storitev, ki služi znanosti. Zagotavlja jo multidisciplinarna ekipa iz švicarskega inštituta za bioinformatiko (angl. Swiss Institute of Bioinformatics ali SIB). Omogoča dostop do različnih podatkovnih baz in analitičnih orodij, namenjenih analizi beljakovin in proteomiki. Podatkovne baze ExPASy vključujejo SWISSPROT in TrEMBL, SWISS-2DPAGE, PROSITE, ENZYME in SWISS-MODEL. Orodja za analizo so na voljo za posebne naloge, ki so pomembne v proteomiki, ter iskanja podobnosti, iskanja vzorca in profilov, napovedi post-translacijskih modifikacij, napovedovanje topologije, analiza primarne, sekundarne in terciarne proteinske strukture ter poravnava več zaporedij. Te podatkovne zbirke in orodja so tesno povezana med seboj: poseben poudarek je na vključevanju vnosov zbirke podatkov s povezanimi sredstvi, razvitimi v SIB in drugod. Orodja proteomike so bila oblikovana tako, da berejo anotacije v SWISS-PROT z namenom izboljšanja njihove napovedi [13].

ExPASy je glavni gostitelj naslednjih zbirk podatkov, ki jih je delno ali v celoti razvil SIB v Ženevi [13]:

- SWISS-PROT knowledgebase (<http://www.expasy.org/sprot/>) je podatkovna baza proteinskih zaporedij, ki zagotavlja visoko kakovostne anotacije (kot je opis funkcije proteina, njegove domenske strukture, post translacijske modifikacije in variante), minimalno raven redundance in visoko stopnjo integracije z drugimi podatkovnimi zbirkami. SWISS-PROT dopolnjuje TrEMBL, ki vsebuje računalniško zabeležene vnose za vse sekvence, ki še niso integrirani v SWISS-PROT. SWISS-PROT in TrEMBL sta skupinsko vzdrževani s strani SIB in Evropskega inštituta za bioinformatiko (EBI).
- SWISS-2DPAGE (<http://www.expasy.org/ch2d/>) je podatkovna baza beljakovin, identificiranih z dvodimenzionalno poliakrilamidno gelsko elektroforezo (2D-



PAGE). SWISS-2DPAGE vsebuje podatke iz različnih človeških in mišjih bioloških vzorcev, kot tudi iz *Arabidopsis thaliana*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* in *Dictyostelium discoideum*.

- PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite/>) je podatkovna baza proteinskih domen in družin. PROSITE vsebuje biološko pomembne lokacije, vzorce in profile, ki pomagajo zanesljivo določiti, kateri znani proteinski družini pripada novo zaporedje.
- ENZYME (<http://www.expasy.org/enzyme/>) je zbirka informacij glede na nomenklaturu encimov.
- SWISS-MODEL Repository (<http://www.expasy.org/swissmod/smrep.html>) je baza podatkov samodejno generiranih modelov strukturnih beljakovin.

Opisi uporabljenih spletnih portalov so zbrani v Tabeli 1.

Tabela 1: Pregled in kratek opis portalov in njihovih internetnih strani

	Spletna stran	Kratek opis
NCBI portal	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">www.ncbi.nlm.nih.gov</a>	National Center for Biotechnology Information ohranjanja zaporedija nukleinskih kislin v podatkovni bazi GenBank, zagotavlja analizne metode in sredstva za priklic podatkov iz GenBank in drugih bioloških podatkov, ki so na voljo preko spletne strani NCBI. NCBI vključuje različne povezave na številna orodja ali podatkovne databaze.
ExPASy	<a href="http://www.expasy.org">http://www.expasy.org</a>	Portal, ki omogoča dostop do različnih podatkovnih baz in analitičnih orodij, namenjenih analizi beljakovin in proteomiki.

## 3.2 Bioinformatične podatkovne baze

### 3.2.1 PubMed, podatkovna baza literature (NCBI)

Podatkovna baza PubMed vsebuje več kot 21 milijonov citatov, iz več kot 24 000 različnih pomembnih znanstvenih revij. PubMed je močno povezana z drugimi temeljnimi NCBI-jevimi podatkovnimi bazami, s čimer se zagotavlja ključno povezavo med podatki iz molekularne biologije z znanstveno literaturo. PubMed zapisi so prav tako povezani med seboj kot "povezani citati". Jedrnat opis prvih pet najbolj sorodnih citatov so prikazani na privzeti strani povzetka [32].

### 3.2.2 Referenčne sekvence (NCBI)

Podatkovna baza referenčnih sekvenc (angl. Reference Sequence, ali RefSeq) Nacionalnega centra biotehnoloških informacij (angl. National Center for Biotechnology Information, ali NCBI) je zbirka genomskih, transkripcijskih in proteinskih zapisov zaporedij. Ti zapisi so izbrani in hranjeni iz javnih arhivov zaporedij. Baza podatkov vključuje več kot 16 000 organizmov, vsebuje tudi številne genomske in proteinske zapise ter RNA sekvence za prokariote, evkariote in viruse. Podatkovna baza RefSeq se vzdržuje s kombiniranim pristopom avtomatskih analiz, sodelovanja in ročnega ohranjanja za ustvarjanje najnovejšega prikaza sekvenc, njenih funkcij, nazivov in navzkrižnih povezav na sorodne vire informacij. Podatkovna baza RefSeq je dostopna na spletni strani <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>. RefSeq združuje genomsko, transkripcijsko in proteinsko zaporedje nekega organizma skupaj z opisno pripombo o funkciji in bibliografskimi podatki. NCBI gradi RefSeq iz podatkov zaporedij, ki so na voljo v javnih arhiviranih zaporedjih iz INSDC podatkovnih baz (angl. International Nucleotide Sequence Database Collaboration, ki vključuje DNA Data Bank iz Japonske, evropski European Nucleotide Archive in GenBank). Edinstvene značilnosti zbirke RefSeq vključujejo široko taksonomsko področje, zmanjšanje redundance, informativne navzkrižne povezave med zapisi nukleinskih kislin in proteinov ter dnevno ohranjanje in vzdrževanje. Podatkovne povezave vključujejo imena, proteinske domene, ortologijo, fenotipe in bolezni. Ohranjanje in vzdrževanje odražajo nove informacije in tako lahko

zbirke RefSeq omogočajo podporo številnim raziskovalnim usmeritvam. Baza podatkov RefSeq je produkt NCBI, oddelek nacionalne knjižnice za medicino ZDA pri National Institutes of Health (Državni zdravstveni inštituti). Zapisi so na voljo brezplačno preko več metod. RefSeq zapise je mogoče prepoznati po izraziti pristopni obliki (aaccession number ali številki dostopa), ki vključuje podčrtaj ("\_") na tretjem mestu. Zapisi RefSeqGene pogosto izrecno predstavljajo samo del znanega mRNA in kodirajoče regije. Eksonske regije se navede v evidenci referenčne sekvence gena [27].

### **3.2.3 Sekvence iz GenBank in drugih virov (NCBI)**

Sekvence iz GenBank je mogoče iskati v in pridobiti iz treh Entrez podatkovnih baz: Nucleotide (nukleotidna), Expressed Sequence Tag (EST) in Genome Survey Sequence (GSS). Podatkovna baza nukleotidov vsebuje vsa zaporedja podatkovne baze GenBank, razen tistih, ki spadajo v bazo podatkov EST ali GSS. Kot del standardnega postopka pri oddaji, NCBI proizvaja konceptualne translacije za vsako zaporedje v GenBank, ki vsebuje sekvenco in vključuje te pridobljene proteinske sekvence v podatkovno bazo beljakovin [32].

### **3.2.4 Entrez PubMed (NCBI)**

Entrez je integriran sistem pridobivanja podatkov iz podatkovnih baz, ki omogoča dostop do raznolikih nizov 35 različnih podatkovnih baz, ki skupaj vsebujejo več kot 570 milijonov zapisov. Entrez podpira besedno iskanje z uporabo preprostih logičnih poizvedb, prenos podatkov v različnih formatih in povezovanje evidenc med bazami podatkov, ki temeljijo na bioloških odnosih. V svoji najpreprostejši obliki, lahko vzpostavijo povezavo med sekvenco in izvlečkom članka, v katerem so avtorji poročali o njej, ali pa med proteinsko sekvenco in njegovo kodirajočo DNA sekvenco oziroma z njegovo 3D strukturo. Računsko izpeljane povezave med sosednjimi evidencami, kot so tiste, ki temeljijo na izračunani podobnosti med zaporedji ali med PubMed povzetki, omogočajo hiter dostop do skupin povezanih zapisov. Več priljubljenih povezav je prikazanih kot „Discovery Components“ (komponente odkritja) v desnem stolpcu pri rezultatih iskanja, kar olajša iskanje in raziskovanje. Storitve LinkOut razširja paleto povezav, saj vključuje

zunanje vire, kot so podatkovne baze genomov specifičnih organizmov. Evidence, pridobljene z uporabo Entrez, se lahko prikažejo v številnih formatih in lahko se jih prenese na osebni računalnik [32].

### 3.2.5 Gene (NCBI)

Gene (gen) nudi vmesnik hranjenih sekvenc in opisnih informacij genov s povezavami do NCBI'sMap Viewer, Evidence Viewer, Model Maker, Blink, proteinskih domen in drugih virov, povezanimi z genom. Gene vsebuje podatke za skoraj 8 milijonov genov iz več kot 8400 različnih organizmov. Poleg ohranjanja s pomočjo internega osebja, so ti podatki zbrani in vzdrževani s strani različnih mednarodnih sodelovanj. Znotraj Gene so tudi povezave do najnovejših citatov v PubMed [32].

### 3.2.6 GeneCards

GeneCards ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)) je obsežna, avtoritativna zbirka anotacijskih informacij o človeških genih. Njena gensko usmerjena vsebina samodejno pridobiva informacije in je integrirana z več kot 80 digitalnih virov, kar pripomore k izdelavi genske kartice (Gene Card) za vsakega izmed več kot 73 000 človeških genov, ki zajemajo naslednje kategorije: geni, ki kodirajo proteine, pseudogeni, RNA geni, genski lokus, cluster in ne kategorizirani. Ključni poudarek je na nastavitvah analize gena. GeneCards nudi neposredne povezave do gensko povezanih raziskovalnih reagentov, kot so protitelesa, rekombinantni proteini, kloni DNA in inhibitorne RNA, in funkcije, povezane z genskimi zdravili [30].

### 3.2.7 UniProt-GO Annotation database

Nabor GO podatkov, zagotovljenih s strani UniProt konzorcija (GOA: <http://www.ebi.ac.uk/GOA>) je celovit nabor anotacij, ki temeljijo na dokazanih evidencah pridobljenih iz vira Gene Ontology in UniProtKB beljakovin. Podatkovna baza oskrbuje več kot 100 milijonov anotacij enajstih milijonov beljakovin. Podrobne, ročne anotacije GO, pridobljene iz recenziranih člankov, so priskrbljene s strani UniProt in dopolnjene z

ročnimi in elektronskimi pripombami iz 36 modelnih organizmov in domensko usmerjenih znanstvenih virov. Vključitev visoko kakovostnih, avtomatskih predikcij anotacij zagotavlja naboru podatkov UniProt GO zalogo funkcionalnih informacij za širok spekter beljakovin, vključno s tistimi, katerih organizmi so slabše karakterizirani. UniProt GO anotacije so brezplačno dostopne v različnih oblikah, prek prenosov in spleta. UniProt Knowledgebase (UniProtKB; <http://www.uniprot.org>) je osrednje vozlišče za zbiranje informacij o funkcionalnosti proteinov s točnimi, doslednimi in bogatimi anotacijami. Vključeni med obilico anotacijskih podatkov so podrobne anotacijske izjave genske ontologije, ustvarjene v sodelovanju s projektom Gene ontology (<http://www.geneontology.org>). Konzorcij UniProt je osrednji element konzorcija Gene Ontology, ustanovljenega leta 1998 za razvoj in uporabo niza strukturiranih, kontroliranih slovarjev. Pogoji znotraj GO opisujejo molekularne funkcije in biološke procese, ki jih genski produkti izvajajo, in subcelične lokacije, kjer se nahajajo. GO anotacija je povezava, ki temelji na osnovi dokazov, med identifikatorjem genskega proizvoda (v tem primeru, UniProtKB pristop) in pojmom iz Gene Ontology. Dve dodatni in bistveni komponenti GO anotacije sta prisotnost reference, ki podpira povezavo, in dokazna koda, ki se uporablja za označevanje vrste dokazov. Posamezni dobro opredeljeni genski produkti so lahko anotirani s številnimi GO termini, ki se nahajajo na različnih ravneh v treh GO hierarhijah, glede na podatke, predstavljene v različnih znanstvenih referencah. Znanstvena skupnost zdaj široko uporablja anotacijske sklope GO kot pomoč pri analizi velikih proteomskih in genomskih podatkovnih nizov [8].

### 3.2.8 KEGG

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) je baza znanja za sistematično analizo funkcij genov, ki povezuje genomske informacije s funkcionalnimi informacijami višjega reda. Genomske informacije so shranjene v bazi podatkov GENES, ki je zbirka genskih katalogov za vse popolnoma sekvencirane genome in nekatere delne genome s sodobno anotacijo genov. Funkcionalne informacije višjega reda se shranijo v podatkovno bazo PATHWAY, ki vsebuje grafično predstavitev celičnih procesov kot je metabolizem, membranski transport, signalne poti in celični cikel. Baza podatkov PATHWAY se dopolnjuje z nizom tabel ortolognih genov z informacijami o ohranjenih pod-potih, ki so

pogosto kodirane s položaji pozicijsko vezanih genov na kromosomu in so še posebej koristne pri napovedovanju genskih funkcij. Tretja baza v KEGG je LIGAND za informacije o kemijskih spojinah, encimskih molekulah in encimskih reakcijah. Podatkovne baze KEGG se dnevno posodablja in je na voljo brezplačno na spletni strani <http://www.genome.ad.jp/kegg/> [19].

### 3.2.9 HUGO Gene Nomenclature Committee

HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) dodeli odobrene genske simbole človeškemu lokusom. Trenutno je več kot 33.000 odobrenih genskih simbolov, katerih večina kodira gene proteinov, ampak tudi druge vrste lokusov, kot so nekodirajoči RNA, psevdogeni in fenotipski lokusi. Kjer je to pomembno, HGNC organizira te gene v genske družine in skupine. Spletna stran HGNC, dostopna preko spletnega naslova <http://www.genenames.org/> je spletna zbirka HGNC odobrenih genskih nomenklatur in z njimi povezanimi viri za človeške gene in vsebuje povezave do genomske, proteomske in fenotipske informacije. Poleg tega vsebuje spletne strani, namenjene genskim družinam. Te strani se naglo razširjajo preko uporabe HGNC podatkov in na podlagi informacij, pridobljenih iz zunanjih virov [7].

### 3.2.10 OMIM

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) je obsežna baza znanja o človeških genih in genskih boleznih, zbranih v podporo genetskim raziskavam in izobraževanju ter prakse klinične genetike. OMIM (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>) je v elektronski obliki dostopen preko National Center for Biotechnology Information (NCBI), kjer je integriran z zbirko podatkov in podatkovnih baz Entrez. Vsak OMIM vnos vsebuje besedilo celotnega povzetka gensko določenega fenotipa in/ali gena ter številne povezave do drugih genetskih podatkovnih baz, kot so DNA in proteinske sekvence, PubMed reference, splošne in lokusno specifične podatkovne baze mutacij, HUGO nomenklature, MapViewer, GeneTests in mnoge druge. OMIM je preprost in enostaven portal bliskovito naraščajoče količine informacij človeške genetike. Iskanja v OMIM je mogoče opraviti na spletni strani OMIM ali preko katerekoli strani v zbirki podatkovnih baz NCBI Entrez. Informacije v

OMIM je mogoče pridobiti s poizvedbami z uporabo MIM številke, motnje, imena in/ali simbola gena ali v preprostem angleškem jeziku. Funkcija omejitev se lahko uporablja pri opravljanju omejenega iskanja delov MIM vnosa (številka, naziv, reference, itd) in/ali vrsto MIM vstopa (gen ali fenotip). Ne glede na uporabljeno metodo, iskalnik razvrsti vnose, ki se ujemajo s poizvedbo, z najpomembnejšim na vrhu in prikaže seznam najboljših deset rezultatov. Na domači strani OMIM je mogoče pregledati OMIM Statistics (OMIM statistika), ki vsebuje aktualno število vnosov v OMIM. Domača stran OMIM vzdržuje povezave do številnih koristnih genskih virov, vključno z Genetic Alliance, krovno organizacijo več kot šestotih genetskih podpornih skupin. Znotraj OMIM vnosa, modra črta vzdolž leve strani zagotavlja meni neposrednega dostopa do podnaslovov vnosa. Poleg tega obstajajo povezave do virov, znotraj in izven OMIM baze [15].

Opisi uporabljenih podatkovnih baz so zbrani v Tabeli 2.

Tabela 2: Pregled in kratek opis podatkovnih baz in njihovih internetnih strani

	Spletna stran	Kratek opis
PubMed (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/</a>	Podatkovna baza PubMed vsebuje več kot 21 milijonov citatov, iz več kot 24 000 različnih pomembnih znanstvenih revij. PubMed je močno povezana z drugimi temeljnimi NCBI-jevimi podatkovnimi bazami, s čimer se zagotavlja ključno povezavo med podatki iz molekularne biologije z znanstveno literaturo.
RefSeq (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/</a>	Podatkovna baza referenčnih sekvenc je zbirka genomskih, transkripcijskih in proteinskih zapisov zaporedij. Ti zapisi so izbrani in hranjeni iz javnih arhivov zaporedij.
GenBank		

(NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/</a>	Sekvence iz GenBank je mogoče iskati v in pridobiti iz treh Entrez podatkovnih baz: Nucleotide (nukleotidna), Expressed Sequence Tag (EST) in Genome Survey Sequence (GSS). NCBI proizvaja konceptualne translacije za vsako zaporedje v GenBank, ki vsebuje sekvenco in vključuje te pridobljene proteinske sekvence v podatkovno bazo beljakovin.
Entrez PubMed (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/gquery</a> (oblika iskalnika Entrez)	Entrez je integriran sistem pridobivanja podatkov iz podatkovnih baz, ki omogoča dostop do različnih podatkovnih baz.
Gene (NCBI)	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a>	Gene nudi vmesnik hranjenih sekvenc in opisnih informacij genov s povezavami do NCBI'sMap Viewer, Evidence Viewer, Model Maker, Blink, proteinskih domen in drugih virov, povezanimi z genom.
GeneCards	<a href="http://www.genecards.org">www.genecards.org</a>	Obsežna, avtoritativna zbirka anotacijskih informacij o človeških genih.
UniProt-GOA	<a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA">http://www.ebi.ac.uk/GOA</a>	Je celovit nabor anotacij, ki temeljijo na dokazanih evidencah



		pridobljenih iz vira Gene Ontology in UniProtKB beljakovin.
KEGG	<a href="http://www.genome.ad.jp/kegg/">http://www.genome.ad.jp/kegg/</a>	Baza znanja za sistematično analizo funkcij genov, ki povezuje genomske informacije s funkcionalnimi informacijami višjega reda.
HGNC	<a href="http://www.genenames.org/">http://www.genenames.org/</a>	Spletna zbirka HGNC odobrenih genskih nomenklatur in z njimi povezanimi viri za človeške gene in vsebuje povezave do genomske, proteomske in fenotipske informacije.
OMIM	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/</a>	Obsežna baza znanja o človeških genih in genskih boleznih, zbranih v podporo genetskim raziskavam in izobraževanju ter prakse klinične genetike.

### 3.3 Bioinformatična orodja

#### 3.3.1 NCBI BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) je program za iskanje podobnosti zaporedij, ki se lahko uporablja prek spletnega vmesnika ali kot samostojno orodje za primerjavo uporabnikovega zaporedja z zaporedji v spletni podatkovni bazi. Javni vmesnik programa BLAST se nahaja na spletni strani NCBI podatkovne baze: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>. Različice programa BLAST primerjajo vse kombinacije nukleotidnih ali proteinskih zaporedij z nukleotidnimi ali proteinskimi zaporedji v podatkovnih bazah. BLAST je hevristična metoda, da ugotavlja kratka ujemanja med dvema sekvencama in poskuša pričeti poravnavo na teh "vročih točkah". Poleg izvajanja poravnave, BLAST vsebuje statistične podatke o poravnavi; to je pričakovana vrednost ali lažno pozitivna stopnja. BLAST je eden od najbolj široko uporabljenih bioinformatičnih raziskovalnih orodij. Ključne strani BLAST-a imajo zdaj dosledno obliko in strukturo. Vsaka stran ima glavo, ki vsebuje povezave na domačo stran NCBI-ja in prijavnno polje za prijavo na NCBI ter možnost prilagajanja vmesnika, My NCBI (moj NCBI). Tik pod glavo je seznam povezav (imenovanih "drobtinice," angl. 'breadcrumbs'), ki prikazujejo lokacijo trenutne strani in omogoča navigacijo do sorodnih strani. Tudi v glavi so zavihki, ki omogočajo dostop do glavne strani aplikacije in so slednji:

- Domov (Home): navigacija do BLAST obrazcev, specifičnih podatkovnih baz organizmov, specializiranih orodij, nasvetov in novic.
- Shranjene strategije (Saved Strategies): izpolnjeni BLAST obrazci, ki so shranjeni na My NCBI.
- Nedavni rezultati (Recent Results): povezave do še neizteklih BLAST rezultatov
- Pomoč (Help): direktorij dokumentacije.

Ko uporabnik začne novo delo z izpolnitvijo BLAST obrazca, BLAST takoj predstavi Running Job stran (stran tekočega dela), ki poroča o stanju tekočega dela in poda oceno, kako dolgo bo trajalo, da se to delo zaključi. Možno je tudi spremeniti parametre za oblikovanje BLAST dela na Format Control strani (stran nadzora formata) medtem, ko se delo izvaja, saj se formatiranje izvrši šele po iskanju in usklajevanju. Ko se delo zaključi,

BLAST predstavi BLAST poročilo (BLAST Report). Iz poročila, lahko uporabnik ponovno formatira trenutno tekoče opravilo z uporabo istih izhodiščnih parametrov kot izhodišče ali pa z navigacijo na katero od drugih strani aplikacije. Stran nedavnih rezultatov (Recent Results) kaže stanja in nekatere parametre uporabnikovih še neizteklih BLAST opravil ter neposredne povezave do BLAST poročil za vsako opravljeno delo. The BLAST home page is always available from each page header's Home tab. Along the right side of the page are tips and news about BLAST. The top section of the page links to several organism-specific BLAST pages, in order of how often they are used as species limits in BLAST searches. Other species-specific BLAST pages are available from the 'list all genomic databases' link, which temporarily leads to the MapViewer home page. Domača stran BLAST je vedno na voljo na zavijku v vsaki glavi strani. Ob desnem robu strani so nasveti in novice o BLAST. Zgornji del strani vsebuje povezave do različnih specifičnih BLAST strani točno določenih organizmov, kateri so pogosto uporabljeni kot omejitve pri BLAST iskanjih. Spletne strani ostalih specifičnih organizmov so na voljo na seznamu vseh genomskih podatkovnih baz (angl. list all genomic databases), ki začasno vodi do domače strani MapViewer. MapViewer vsebuje taksonomski direktorij, kateri vsebuje povezave do velikega BLAST strani organizmov različnih vrst. Osrednji del domače strani vsebuje povezave in opise pet splošnih BLAST oblik: Nucleotide BLAST, Protein BLAST, blastx, tblastn in tblastx. Nucleotide BLAST vključuje standardni blastn, megablast in discontinuous megablast in predstavlja te tri možnosti kot alternativne algoritme pri preiskovanju nukleotidnih podatkovnih baz z nukleotidno poizvedbo. Podobno, Protein BLAST zaobjema blastp, PSI-BLAST in PHI-BLAST. Na dnu domače strani najdemo seznam specializiranih BLAST vrst, kot iskanje SNP-jev (Single Nucleotide Polymorphism) ali iskanje profilov genske ekspresije in orodja, ki uporabljajo BLAST kot povezovalno tehnologijo, kot sta bl2seq ("BLAST two sequences," ki poravnava dve sekvenci), ki uporablja BLAST za poravnavo, vendar ne za iskanje [18].

### 3.3.2 GORIV

Linearno in urejeno zaporedje aminokislin, kodirano in konzervirano z linearnim in urejenim zaporedjem nukleotidnih baz, kodira vse, kar je značilno za žive organizme: posebne in organizirane interakcije v prostoru in času med proteini, lipidi, nukleinskimi

kislinami in celičnimi metaboliti. Te lastnosti so odvisne od tega, kako se lahko protein zvije v edinstveno aktivno tridimenzionalno strukturo. Ta proces je spontan v danih pogojih, čeprav lahko procesu pripomorejo tudi nekatere žive celice, tako imenovani šaperoni, ki katalizirajo proces. Veliko truda je bilo namenjenega izračunu prostorske strukture polipeptidne verige preko analize aminokislinskega zaporedja z omejenim ampak kljub temu spodbudnim rezultatom, ko je polipeptid daljši od 10-20 aminokislin. Vendar detekcija strukturnih lastnosti proteina, kot so  $\alpha$ -vijačnice,  $\beta$ -sheets in aperiodična struktura ali tuljave je privedla do zanimivih rezultatov. Ti rezultati so bili v pomoč pri oblikovanju novih proteinov, napovedovanju vpliva točkovnih mutacij, identifikaciji razreda beljakovine, itd. Ta informacija je danes koristna za številne molekularne biologe in beljakovinske modelarje. Običajno je čas izračuna krajši in mnogi programi predikcije sekundarne strukture so na voljo biologom preko spleta. Metoda GOR je ena izmed najbolj priljubljenih metod napovedovanja sekundarnih proteinskih struktur in je bila prva, ki se je izvajala kot računalniški program. Ime GOR sestavljajo tri črke, vsaka od njih je začetnica imena enega izmed avtorjev prvotne objave [12]. GOR IV je četrta različica programa GOR za napovedovanje proteinske sekundarne strukture, ki temelji na informacijski teoriji. Metoda je dostopna preko povezav iz spletnih portalov, kot so NCBI ali ExPASy, kjer ga najdemo med orodji napovedovanja sekundarne proteinske strukture.

### 3.3.3 PSIPRED

Spletni strežnik PSIPRED združuje več beljakovinskih anotacijskih orodij in zagotavlja storitve ali programske opreme, ki uporabnikom omogočajo opravljanje resnično široke biološke analize. Razpoložljive metode so razvrščene v dve osnovni domači strani. Protein Analysis Workbench se ukvarja s proteinsko sekvenco, Protein Structure Workbench pa s proteinsko strukturo beljakovin. Delovno okolje PSIPRED daje na voljo naslednje metode anotacije zaporedij in strukture: PSIPRED, GenTHREADER, pGenTHREADER, pDomTHREADER, MEMSAT-SVM/MEMSAT3, MEMPack, BioSerf, MetSite, HSPred, DISOPRED2, DomPred in FFPred. Vhodni obrazec temelji na osnovi zavihkov, s strokovnimi kontrolnimi opcijami za nekatere metode analize, ki se pojavljajo ob njihovem izboru v pop-up zavihkih na strani. Vsa programska oprema in storitve so na voljo na spletni strani UCL Bioinformatics Group na <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/> [5].

### 3.3.4 Porter

Porter je sistem napovedovanja sekundarne proteinske strukture. Opira se na dvosmerne ponavljajoče nevronske mreže z bližnjicami do povezav, natančno kodiranje vhodnih profilov, pridobljenih iz več poravnanih zaporedij, ponavljajoče nevronske mreže druge stopnje, in vključevanje velikega števila informacij. Natančnost programa Porter presega 79%. Porter je na voljo brezplačno na spletni strani <http://distill.ucd.ie/porter/> [26].

### 3.3.5 TargetP

Večina proteinov evkariontskih celic je kodiranih v jedrskem genomu in sintetiziranih v citosolu. Mnogi izmed njih potrebujejo dodatno razporeditev v eno ali drugo subcelično komponento. Ko je končni cilj mitohondrij, kloroplast ali pot izločanja, razvrščanje običajno temelji na prisotnosti N-terminalne tarčne sekvence, ki je prepoznana s strani translokacijskih mehanizmov. V večini primerov je tarčna sekvenca kasneje proteolitično odstranjena. Signalni peptidi so odgovorni za usmerjanje proteinov na endoplazemski retikulum (ER) za nadaljnji transport skozi sekretorno pot. Signalni peptidi so v splošnem sestavljeni iz treh regij: pozitivno nabita n-regija, hidrofobna h-regija in polarna c-regija, ki vodi do mesta cepitve. Najbolj ohranjen motiv signalnih peptidov je prisotnost majhne in nevtralne aminokisline na mestih blizu cepitve. Bioinformatično orodje, TargetP, napoveduje subcelično lokalizacijo še neraziskanih proteinov. Z uporabo N-terminalnega zaporedja informacij razlikuje med proteini, ki so namenjeni v mitohondrij, kloroplast, v pot izločanja ter drugam s stopnjo uspešnosti 85% (rastline) ali 90% (ne-rastlinski organizmi) z uporabo niza testov zmanjšane redundance. TargetP predvideva tudi cepilna mesta (angl. cleavage sites) s stopnjo pravilno napovedanih mest, ki sega od približno 40% do 50% (kloroplastne in mitohondrijske predhodne sekvence) in ki doseže 70% pri sekretornih signalnih peptidih. TargetP je na voljo na spletni strani: <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/> [9].

### 3.3.6 SOSUI

Bioinformatično orodje SOSUI je dostopno na spletni strani: <http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/>, oziroma SOSUI verzija 1.11 (prva opcija pod številko ena v meniju te spletne strani) pa na spletni strani [http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui\\_submit.html](http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/sosui_submit.html). Aplikacija, imenovana SOSUI, razlikuje med membranskimi in topnimi proteini iz podanih aminokislinskih sekvenc ter napoveduje transmembranske helikse membranskih proteinov. Uporablja metode, ki niso odvisne od poravnave zaporedja, vendar od fizikalno-kemijskih lastnosti aminokislinskih sekvenc. Ta aplikacija ima zelo visoko natančnost napovedovanja in izračuni so zelo hitri. V sistemu SOSUI obstajajo tri osnovne predpostavke. Prvič, membranski proteini so označeni z vsaj enim, primarnim, transmembranskim heliksom, ki je še posebej hidrofoben. Drugič, lahko obstajajo tudi hidrofilni transmembranski heliksi, čeprav njihova hidrofnost je v bistvu podobna hidrofnim segmentom topnih proteinov. Možna vloga sekundarnih transmembranskih heliksov je tvorba aktivnih proteinskih območij. Tretjič, primarni transmembranski heliksi so stabilizirani s kombinacijo amfifilnih stranskih verig na koncu heliksa, kot tudi z visoko hidrofnostjo v srednjem območju. Ko so polarne interakcije najdene tudi v središču primarnega heliksa, njihov obstoj običajno dokazuje vlogo pri stabilizaciji transmembranskih heliksov. Polipeptid je lahko membranski protein, če vsebuje vsaj en transmembranski heliks. Program razlikuje membranske proteine od topnih s predikcijo o obstoju primarnega transmembranskega heliksa določene sekvence. Analiza tridimenzionalne strukture membranskih proteinov je pokazala, da je približno tretjina transmembranskih heliksov zelo hidrofnih. Sistem SOSUI je orodje, ki temelji na spletni uporabi in kjer lahko uporabniki predložijo svojo vneseno sekvenco. Rezultati se običajno vrnejo v 1 min. Dve pomembni napovedi sta predstavljeni na izhodni strani: vrsta beljakovine in regija transmembranskih heliksov, ko je protein membranskega tipa. Vhodna dolžina sekvence je omejena na 20-5000 aminokislin. Natančnost klasifikacije beljakovin sistema SOSUI, ki opravlja analizo pri določanju tipa proteina, je bila 99%, medtem ko je ustrezna vrednost napovedovanja transmembranskih heliksov 97% [17].

Opisi uporabljenih bioinformatičnih orodij so zbrani v Tabeli 3.

Tabela 3: Pregled in kratek opis bioinformatičnih orodij in njihovih internetnih strani

	Spletna stran	Kratek opis
NCBI BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast</a>	Program za iskanje podobnosti zaporedij. Različice programa BLAST primerjajo vse kombinacije nukleotidnih ali proteinskih zaporedij z nukleotidnimi ali proteinskimi zaporedji v podatkovnih bazah.
GORIV	<a href="http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html">http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html</a>	GOR IV je četrta različica programa GOR za napovedovanje proteinske sekundarne strukture, ki temelji na informacijski teoriji.
PSIPRED	<a href="http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/">http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/</a>	Spletni strežnik PSIPRED združuje več beljakovinskih anotacijskih orodij in zagotavlja storitve ali programske opreme, ki uporabnikom omogočajo opravljanje resnično široke biološke analize.
Porter	<a href="http://distill.ucd.ie/porter/">http://distill.ucd.ie/porter/</a>	Sistem napovedovanja sekundarne proteinske strukture.
TargetP	<a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/">http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/</a>	Napoveduje subcelično lokalizacijo še neraziskanih

		proteinov.
SOSUI	<a href="http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/">http://harrier.nagahama-i-bio.ac.jp/sosui/</a>	Aplikacija razlikuje med membranskimi in topnimi proteini iz podanih aminokislinskih sekvenc ter napoveduje transmembranske helikse membranskih proteinov.



## 4 REZULTATI

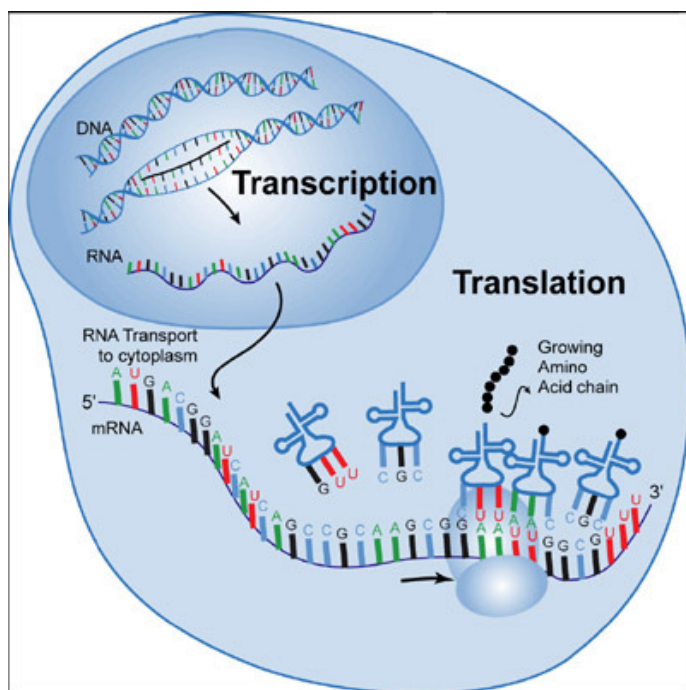
V preteklosti skupno število človeških SAA genov in mRNA ni bilo popolnoma znano. Podatki aminokislinskih sekvenc, pridobljenih iz človeških amiloidnih vlaken tipa AA in njihovih predhodnih proteinov so pogosto nakazovali, da obstajajo več kot trije geni. Sedaj obstajajo trdni dokazi o obstoju več kot treh SAA genov pri človeku: iz sedmih cDNA vzorcev, izoliranih iz enega posameznika, je bilo mogoče razbrati pet različnih mRNA sekvenc. Nukleotidna zamenjava je lahko artefakt kloniranja cDNA ali pa lahko predstavlja spremembo na alelu. Nekateri izmed izoliranih cDNA klonov se razlikujejo le za eno bazno zamenjavo. Bilo je ugotovljeno, da to sproži posledično zamenjavo aminokislin na beljakovinski ravni, in te razlike predstavljajo posamezne genske prepise. Bilo je razbranih najmanj pet različnih prepisov iz šestih različnih mRNA enega organa [35]. Ugotovitve več transkriptov jetrne cDNA med akutno fazo enega posameznika jasno kažejo, da med akutno fazo poteka pri človeku translacija vseh teh variant. Specifični 3' segmenti so lahko povezani z morebitno post-transkripcijsko regulacijo SAA genske ekspresije. Segment DNA (ki kodira aminokislinske ostanke na lokaciji 33-45), je stalnica pri vseh človeških zaporedjih SAA, in ni najdene razlike na beljakovinski ravni v primerjavi z različnimi vrstami, kar kaže na njegovo pomembno funkcijo. Očitno je ta del visoko evolucijsko ohranjen. Minimalno število treh lokusov (izotipov) lahko pojasni spekter cDNA heterozigotnega posameznika; vsak lokus bi lahko kazal precejšnji polimorfizem [35].

SAA1 in SAA2 (SAA1/2) sta akutna in inducibilna izotipa s ~ 95% sekvenčno identiteto, človeški SAA3 je bil okarakteriziran kot psevdogen in SAA4 je bil do nedavnega obravnavan kot konstitutivno izražen. SAA4 se razlikuje od SAA1 po aminokislinski dolžini (SAA4 je daljši za osem aminokislin) in deli si le 55% sekvencne identitete z SAA1. SAA1 ima najmanj pet alelov, od katerih trije kodirajo različne beljakovine (SAA1.1, SAA1.2 in SAA1.3). Molekulska masa proteina SAA1 (in tudi SAA2) je okoli 12 kDa, po separacijski metodi poliakrilamidne gelske elektroforeze v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata (SDS-PAGE). Njegova koncentracija v krvnem obtoku se med akutno faznim odzivom lahko bistveno poveča, do 1000-krat, zaradi vnetja, okužbe ali poškodb tkiva. Poveča pa se v roku nekaj ur po začetnem dražljaju in domneva se, da ima zaščitno vlogo, dokler njegova koncentracija ne pade ponovno na izhodiščne vrednosti, v

približno 7 dneh [20]. Če se koncentracija SAA1/2 ne povrne na običajno raven, nastane kronično vnetje.

## 4.1 Centralna dogma molekularne biologije

Klasičen pogled centralne dogme molekularne biologije določa, da se kodirane genetske informacije v molekuli DNA prevedejo v sestavljen mRNA. Vsak mRNA vsebuje program za sintezo določenega proteina (Slika 2). Komplementarna sekvenca DNA je sekvenca ene verige dvovijačne verige DNA in služi kot vzorec za izgradnjo druge vijačnice. Obe verigi DNK sta antiparalelni; sta vzporedni druga z drugo, vendar sta usmerjeni v nasprotno smer. Vsaka veriga DNA se bere v določeni smeri, od 5 "(pet konec) do njenega 3" (tri konec) [25]. Preden se sproži sinteza proteina, se ta dvojna vijačnica razpre. Takrat encim RNA polimeraze kopira segment DNA na RNA. Ta proces izdelave RNA iz DNA imenujemo transkripcija. V evkariontih, DNA ostane v jedru, medtem ko pa tvorjenje proteinov poteka v citoplazmi. Torej je potrebno navodila iz DNA zapisati na RNA (ribonukleinska kislina), molekulo, ki se premakne v citoplazmo in služi kot vzorec za izdelavo proteina. Ker ta RNA nosi informacije za proizvodnjo proteina, oziroma vsebuje kopijo določenega gena, se imenuje messenger RNA (mRNA). Gen evkariontskih organizmov vsebuje eksone in introne. Eksoni so izražene regije DNA, ki so prevedene v beljakovine. Introni so vmesne regije, ki niso prevedene v beljakovine.



Slika 2: Prikaz centralne dogme molekularne biologije. V jedru celice poteka prenos informacij iz DNA na mRNA (transkripcija), ki nato potuje v celično citoplazmo, kjer s pomočjo ribosomov poteka translacija v proteine. (Vir: [http://www.tokresource.org/tok\\_classes/biobiobio/biomenu/transcription\\_translation/](http://www.tokresource.org/tok_classes/biobiobio/biomenu/transcription_translation/))

Funkcije intronov so lahko različne, ena od katerih je regulacija transkripcije. Primarni transkript vključuje tako eksone kot introne. Pred selitvijo iz jedra v citoplazmo, RNA gre skozi proces splicing-a, ki odstrani introne in združi eksone skupaj, kar tvori zrelo mRNA, katera bo uporabljena v procesu translacije v beljakovino. Proces RNA transkripcije SAA1 je nakazan na sliki 3. Kodirajoče območje (imenovano tudi kodirajoče zaporedje, označeno z CDS) je del mRNA, ki se dejansko prevede v protein. mRNA ima neprevedeno regijo na vsakem koncu, ki sta poimenovani 5' UTR (angl. untranslated region, oziroma neprevedena regija) in 3' UTR. RNA vsebuje tudi regulatorne regije. To je transkripcijsko startno mesto in se nahaja tam, kjer RNA polimeraza prepíše vzorec iz matrične DNA na mRNA (v primeru SAA1 je to prvi ekson?). V citoplazmi, ribosomi vršijo proces prevajanja zaporedja nukleotidnih baz zrele mRNA v točno določeno zaporedje aminokislin. Ta proces se imenuje translacija. Vsako aminokislino določa niz treh nukleotidnih baz, ki se imenuje kodon. Ker je možnosti veliko, aminokislin pa le dvajset, lahko različni kodoni kodirajo isto aminokislino. Ena ali več aminokislinskih verig tvori velike kompleksne molekule imenovane proteini (ali beljakovine). Ti opravljajo različne aktivnosti v celici [25].

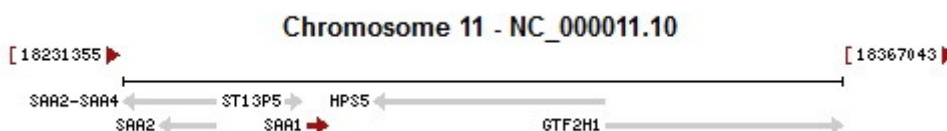
## 4.2 Referenčna sekvenca gena SAA1 na kromosomu 11

Spletni portal NCBI nudi svoj brskalnik, v katerem se lahko sproži iskanje zelene nukleotidne sekvence iskanega gena. Na levi izberemo možnost „nukleotide“, medtem ko v desno polje vpišemo ime ali dostopno številko (accession number) gena. Preden sprožimo iskanje, lahko vzpostavimo različne filtre (kot na primer lahko označimo, da iščemo gen za vrsto *Homo sapiens*), za učinkovitejše iskanje. Nato se pojavi seznam, izmed katerega izberemo iskano zaporedje.

Vir sekvence: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_021330.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_021330.1)

Accession number (številka dostopa): NG\_021330

Sekvence, označene s ključno besedo RefSeqGene (referenčne sekvence gena) v NCBI-jevi nukleotidni bazi podatkov, služijo kot stabilna podlaga pri poročanju mutacij, vzpostavitvi konvencij številčenja eksonov in intronov ter določanju koordinat ostalih različic. Sekvence RefSeqGene so usklajene z referenčnimi kromosomi, ter sedanje in prejšnje kromosomske koordinate so na voljo zaradi ponovne uskladitve [1]. Human gen SAA1 je lociran na kromosomu 11p15.1 (Slika 3) in je velik skupno 3717 baz (Slika 4).



Slika 3: Lociranje SAA1 gena na kromosomu in drugi okoliški geni (vir:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6288>).

```

1  ttttcacagt tcatttacgg ccctctttcc aacacattca ctgccaatca tcttattgac
61 aataactgta ttgttgaacc ttccagtatc ctgcattccc ggatcaaggc cccctcaaag
121 ccctgatatg caaatatctg ggaaaagaat gttccagagg aaaggaacag ctaatccgag
181 gccctaggg taagatgtgc ctgggggttt ggagaccagt gtggccagag caaatgagc
241 aggaggagag aattggatga tgaggtacga gaggaaggag ttaggacagt ttgagtaaag
301 tttgaaaacc attataaggg ctttgacttc aactatgagt ggaagtggaa tcctccggag
361 agttttgaat ggagagtgat agaagttgtc ttgtgttgta acagtctggc tgctatactg
421 aaaagagact agttggcggc aaagggggaa atgtggaagc cagttaagaa gccatcataa
481 cccagaaggt gatgcctaata aacatctctc tgggagcagc ggagagatga taagggtttg
541 ctttctgaat atgttttttg acaattaatg taaacatttc aagtaggctg agattttatt
601 gcatattaac aatgtccatg ttcactcgcg gcagccgccc ccttctgcgc ggcatgccc
661 agccagcacc tgggcctgga actgggccc agccccagc ttcaccacc acctccctac
721 catggacccc tgcaaagtga acgagcttcg ggcctttgtg aaaatgtgta agcaggatcc
781 gagcgttctg cacaccgagg aaatgcgctt cctgagagag tgggtggaga gcatgggagg
841 taaagtacca cctgctactc agaaggctaa atcagaagaa aataccaagg aagaaaaacc
901 tgatagtaag aaggtggagg aagacttaaa ggcagacgaa ccatcaactg aggaaagtga

```

961	tctagaaatt	gataaagaag	gtgtgattga	accagacact	gatgctcctc	aagaaatggg
1021	agatgaaaat	gtggagataa	cggaggagat	gatggatcag	gcaaatagata	aaaaagtggc
1081	tgctattgaa	gtcctaaatg	atgggtgaact	ccagaaagcc	attgacttat	tcacagatgc
1141	catcaagctg	aatcctcgct	tggccatttt	gtatgcaaag	agggccagtg	tcttcgtcaa
1201	attacagaag	ccaaatgctg	ccatccaaga	ctgtgacaga	gccattgaaa	taaactctga
1261	ttcagctcag	ccttacaagt	ggcgggggaa	agcacacaga	cttctaggcc	actgggaaga
1321	agcagcccat	gatcttgcct	ttgcctgtaa	attggattat	gatgaagatg	ctagtgcaat
1381	gctgaaagaa	gttcaaccta	gggcacagaa	aattgcagaa	cattggagaa	agtatgagcg
1441	aaaacatgaa	gagcgagaga	tcaaagaaag	aatagaacga	gttaagaagg	ctcaagaaga
1501	gcaggagaga	gcccagaggg	aggaagaagc	cagacgacag	tcaggagctc	actatggccc
1561	ttttccaggt	ggctttcctg	gtggaatgcc	tggttaatttt	cccggaggaa	tgcttggaat
1621	gggagggggac	atgcctggaa	tggccggaat	gcctggactc	aatgaaattc	ttagtgatcc
1681	agaggctcct	gcagccatgc	aggatccaga	agttatggtg	gccttccagg	atgtggctca
1741	gaaccagca	aatatgtcaa	aataccagag	caaccctaaag	gttatgaatc	tcatcagtaa
1801	attgtcagcc	aaatttggag	gtcaagcata	atgcccttct	gataaataaa	gcctgctga
1861	agggaaagca	acctagatca	ccttatggat	gtcgcaataa	tacaaacca	cgttaactctg
1921	accttctcat	caagagagct	ggggtgcttt	gaagataatc	cctaccctc	tcccccaat
1981	gcagctgaag	cattttacag	tggtttgcca	ttagggtatt	cattcagata	atgttttct
2041	actaggaatt	acaaacttta	aacacttttt	aaatcttcaa	atatttataa	caaatttataa
2101	gggtctgtta	attcttatat	ttttctttac	taatcattgt	ggatttttcc	ttaaattatt
2161	gggcagggaa	tatacttatt	tatggaagat	tactgctcta	atttgagtga	aataaaagtt
2221	attagtgcga	ggcaaacata	aaaaaaaaa	gtccatgttc	atctctaaat	gacatcattg
2281	ttccaaagct	tttccattct	tcttaacctt	ccacctgtca	atctatagga	gatgacttct
2341	cctacttcac	tcatgcattg	actccttcaa	tcaataaaaag	tgactaagaa	cctgctacag
2401	gtgaggtgct	gtgtttggtg	ttaaagtgc	aacagttatc	tgtcaataag	cctgacaagg
2461	ttcctatccc	tgtgttttgt	gcactctggg	tcaaactcag	aatgcaaac	aggtggagag
2521	cgatgagttc	tatgactggt	aaagaaaagg	gcctgctggt	ttccctcagg	atctctgtcc
2581	ttcatctcaa	aatgcactct	ccttggtatc	gttcctctcc	ttcctgtctc	agaggaagac
2641	ctgctcctgc	tacactctgg	gcaaccttgt	ccccgtggcc	ctgtggcccc	ttggttgctg
2701	aagctctatg	tatgccctat	cttttaccct	cagtcaactct	ctctgttaac	attctcctcg
2761	tgccctgtaa	ccctccctca	tctttaaata	aatcctcctc	ctttgacctt	cgcattgtatt
2821	cagtcatgca	actcaacaag	cattttattgc	acagtgatat	tcaatttgcc	acttgctaaa
2881	agtctgaacc	ttggcagctg	aatgtgatca	gaaaaaaagc	acgactgcta	tgactagtct
2941	cacttttaaat	tcattggtcgt	tgaccaagag	ctaccataca	atccactacc	tttctcaagt
3001	tcagtcacat	tcttcttttc	ctagatgtct	gctttctact	tctcttctct	tctgaaactt
3061	cccacaactc	ctcgttcatt	ctcttctcag	ttgacaactt	tgcttccat	ttcaactgaa
3121	aatagaagca	atcagatatg	aacttctggc	tgggcatggt	agctcatgcc	tataacttca
3181	gcacttttggg	aggccaaggc	aggaggactg	caggtttagga	atttgagacc	agcctgggca
3241	acatggtgaa	actcccactg	tactaaaaat	tttaaaaatt	actcaaacat	attggcaaac
3301	aactgcagtc	ccagctactt	gggaggttga	gatgcaagga	tcacttaaac	ctgggaggtc
3361	gaggctgcag	tgagccatga	ttgcaccact	gcactccagc	tcaggcaaca	gagcaagacc
3421	ctgtcttgag	aggagaggag	aagagaggag	gggaggggag	ggcaggggag	gggaggggag
3481	gggaaggagg	aggggagggg	agaggggagg	agagagggga	ggggagggga	ggggagggga
3541	ggggaggaga	ggagatcag	gtgaggagta	tgccaaggag	tgttttttaa	acttactgtt
3601	ttctctttcc	caacaagatt	gtcatttctc	ttaaaaagta	gttatcctga	ggcctatatt
3661	catagcattc	tgaaagaaag	aaaagaaaag	aggaagaaa	gagagaggaa	ggaaggaaag
3721	agaaagagag	aggaaggaa	gagaaagaga	gaggaaggaa	gggaggaaga	gaagaaggga
3781	ggaagaaaag	aaggaaggaa	ggagggaggg	aggaaggga	gggagggaaa	gaggaagaaa
3841	ggagggagaa	aaggaaggaa	gagagagagg	aaggaaggag	gaagagagaa	gaaggaagga
3901	ggaagacaga	gaggaggtaa	ggaagggaag	aaggagaaa	agagaggaag	gaagaaatga
3961	aggaaggaa	gaaagaaaga	aaaaataaaa	gagtgaatac	ggactggaga	agaagaaacc
4021	acagttgctg	ctatatccac	cagcctctct	gcattgctct	gcctcagccc	tgctgggctc
4081	tggtagtgac	cacttccctc	cttccctaatt	tccctaattga	ctaggccagc	tgagcagggc
4141	ttttctgtgc	tgaggaggta	aatctctgga	tatctagact	gaggggtgga	aggagccttc
4201	cagggcacac	atgagacatg	gcaggggtag	gctgctagtt	ttattttgtt	ttcttttaga
4261	cagggtgtct	tgctctgtta	accaggctgg	agtgcagtg	cgtgattata	gctcattgca
4321	gccttgacct	cctgggtctc	ccacaatcct	tccgcttcag	cctcttgagt	agctgggact
4381	gcaggtgcac	actaccacac	cgggtccatt	tattttttata	tttcgtagag	acaagatctt
4441	acagttttgc	acagagtgat	cttaaaactct	tgaccccaag	tgatcctcct	gccttggcct
4501	ccaaaagcat	tgggattata	ggagtgcagc	actgtgctgg	acctagtctg	tcagctttga
4561	agcttttagat	atgaactcag	agggacttca	tttcagaggc	atctgccatg	tgggccagca
4621	gagcccatcc	tgaggaaatg	actggtagag	tcaggagctg	gcttcaaagc	tgccctcact
4681	tcacaccttc	cagcagccca	ggtgcccga	tcacggggct	cccactctca	actccgagc
4741	ctcagccccc	tcaatgctga	ggagcagagc	tggctcctg	ccctgacagc	tgccaggcac
4801	atcttgtttc	ctcaggttgc	acaactggga	taaatgaccc	gggatgaaga	aaccactggc
4861	atccaggaa	ttgtcttaga	ccgttttcta	ggggaaatga	cctgcaggga	ctttcccccag

4921	ggaccacatc	cagcttttct	tcgctcccaa	gaaaccagca	gggaaggctc	agtataaaata
4981	gcagccaccg	ctccctggca	ggcaggggacc	cgcagctcag	ctacagcaca	gatcaggtga
5041	ggagcacacc	aaggagtgat	ttttaaaact	tactctgttt	tctctttccc	aacaagatta
5101	tcatttccct	taaaaaaaaa	agttatccct	gggcatacac	ccataccatt	ctgaagggtg
5161	cttatctcct	ctgatctaga	gaggtaagca	gggtcggggc	tggtagtact	tggtatggag
5221	aacacctggg	aataccaggt	gctaaaggct	ttaagaataa	aaaataatga	tcctgctttg
5281	tgtttatccc	atgttgagtt	ctgtgcgggg	cagagggaac	acacggtaaa	tgcgttatgg
5341	ggaattatag	gctacttgag	ggagtgcacg	tctggtggtg	actcctgcct	tcctccatca
5401	gtgccacgtt	ggcatcctct	tatgcagtcg	ggcttcaggg	ctgatgggtt	cagaaccgag
5461	ggcttctggc	tctgagttag	gtcctgctgc	aagggttccct	agatgagcca	ctgagactct
5521	aataagatcc	agtggaaata	accaggctct	cgtcgggaata	taagtcccaa	gggaagctgt
5581	gccagtcttg	tgggcgactg	cctgacttct	cctttcattt	cagcaccatg	aagcttctca
5641	cgggcctggg	tttctgctcc	ttggctcctg	gtgtcagcag	ccgaagcttc	tttctgctcc
5701	ttggcgaggc	ttttgatgtg	aaggcttcag	aagggtttgca	ggatttctga	agagaaacat
5761	caccctggac	ctgataaaact	ggggaaaaatg	atgctttcgg	aaggctgctt	ttgaaccaca
5821	gagttgctag	tgtctgcgtt	gctgaggcct	gccagggaact	aggggttgct	gggttgcttg
5881	tctcgagctc	ttcagagctg	ctgggaatct	cccctttccc	cgtagtgcag	cttctcaggga
5941	tgtgttaagt	ggatggatca	catttcagaa	gccgctgcaa	ggtgtatcaa	aaacacatct
6001	cctgagccgt	aagggaacgg	gcattccagta	acaacgcaca	cgggggtattt	ttgggcttcc
6061	ttaagatttg	agccgctgcc	ttagggttggt	ctgcccaatg	tgcctgggga	gctgctaaac
6121	agattagaga	gtcgaggatt	gttgtcagtt	actcagagaa	agaacaatca	tcctttccag
6181	gagcacctga	gctgtttgtt	ttgcgtagaa	gatgcaaaat	aaggcctgca	atgggtataa
6241	aatgtccctc	agcataaaat	gcataaggat	atgactaagg	ctggtgactc	ttctgtcttc
6301	tttctccttc	ctccttcgat	ttcctagttg	gataatgtac	agggctcttt	agcctcgctc
6361	tgtcaggggc	tccttctctg	gtttgttctg	tttccattct	tccttctcca	gccttcttga
6421	caagagctgg	gaactaacgt	gcctcaagcc	cccacaagga	ccacagcatt	ttctcattta
6481	gtttcagaat	gactctgtga	cgcaatcttc	ctctcttgga	aggtgagaaa	gctgatcttg
6541	gaaggtgaga	aagctgagac	ttagagcagc	tgaagccaat	gccaggggac	ttactgccag
6601	tcagcaggtg	gcagggcaga	ggttttagcg	cggctgtgct	tgaggtcagc	gctcttgcca
6661	ggtagacgca	tcactgacca	cctcctagag	gttgatgggt	atgaatctca	ggcacaccct
6721	ggcatcacct	gaaataccca	tgccttcaac	tcccagcagc	agtctgcaga	aactggcctg
6781	gggtgtggcc	tgggcactgg	gactttcagt	ttctctctgg	gtgattagaa	agtgcagcca
6841	aggctcacgc	ctgtaattcc	agcactttgg	gaggccaagg	tggatgaatc	acttgaggtc
6901	atgagttccg	gagcagcctg	gccaaactgg	tgaaccccg	tctctactaa	aaatactaaa
6961	atgtagccag	gcgtgggtgg	aggcacctgt	aatcccagct	actcaggagg	ctgaagcacg
7021	agaatcactt	gaaccgcaga	agcagaggtt	gcagtgacta	gagatcgcac	cagtgtcctc
7081	caacctgggt	gcagagcgca	gactccatct	aaaaaaaatg	aaaaagaaat	tgcagcaag
7141	gcagagcacc	actgccctat	tgttctctca	agcaaccac	agcatcagta	cagcctacta
7201	agaaagtatt	tagggacttt	tatgtctcta	acagtcactg	gaactcacgt	cacaatgacg
7261	tgtattccat	ttgcaagaat	atatacttta	ggtcgggggtg	cgggtggctca	cgctgttaat
7321	cccagcactt	tgggaggcca	aggcaggggg	atcacgaggt	caggagttcg	agaccagcct
7381	gaccaacatg	gtgaaatccc	cgtctctact	aaaaatacaa	aaattagcca	ggcgtgatgg
7441	cgcatcgctg	taatctcagc	tactcaggag	gctgaggcag	aagaatctct	tgaacctggg
7501	aggtggaggt	tgcgatgagc	tgagatagca	ccactgcact	ccagcctggg	cgacagagca
7561	agactctgtc	taaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaagaatata	aacttttagta
7621	gtcagggcag	aagtactctg	tgtctgccac	ctttctcagc	atcagtattc	catgtcacta
7681	cctcattcat	acacactcct	ggatcttata	ataggcagct	tcattctata	gcagtggctc
7741	ttcaccaggg	cacttgaaga	agccaactag	gataaaggaa	tgtgcttctc	aacctatggt
7801	atccaaggct	gctatgatca	caggctgaaa	gcttgaagtc	agtggaaagt	ttgtcttccc
7861	tcattccctc	ctaagggtgt	gttgaggtct	ttatgttctc	ctgatgtccc	ttctgccttt
7921	cctttccttt	ccaggggctc	gggacatgtg	gagagcctac	tctgacatga	gagaagccaa
7981	ttacatcggc	tcagacaaat	acttccatgc	tcgggggaac	tatgatgctg	ccaaaagggg
8041	acctgggggt	gcctgggctg	cagaagtgat	caggtaactg	gagctcctgg	gacgttaggg
8101	ctgggtgagc	agagcttgcc	tgcttgggac	agtcaggagg	gagacgagct	ccttgtggag
8161	aagtttagag	ctgcggcccc	tcctcctctt	gccctctctc	tgctctgtg	ctcagtttga
8221	ggtctgagtg	gatggtagga	gtgagtgaat	cctcatcctc	cctctctggg	tgctgttcat
8281	ccagcctagg	ggtgccagc	ctggctgaat	ggggtgggtc	ccagtgtttt	catccctcct
8341	tccttggcct	ttctgggctc	ctctctgagc	cctcccttgg	aacagggaga	atgggagggg
8401	gggctattgc	tcactggcct	gattattaat	ctccttcttg	cctgccttga	ttacagcgat
8461	gccagagaga	atatccagag	attctttggc	catggtgcgg	aggactcgct	ggctgatcag
8521	gctgccaatg	aatggggcag	gagtggcaaa	gaccccaatc	acttccgacc	tgctggcctg
8581	cctgagaaat	actgagcttc	ctctctcact	tgctctcagg	agatctggct	gtgaggccct
8641	cagggcaggg	atacaaaagc	gggagagggg	acacaatggg	tatctaataa	atacttaaga
8701	ggtggaattt	gtggaaactg	gggtgttatc	tttgtggtat	agactgcctg	tttagtatga
8761	aggggagcgc	catgcacatc	taagtgaacg	tggaggctgg	gtgggtggga	gacgactcct
8821	gggcacacag	ggcatcctgg	gcattccctga	ggcaaggaca	tgatgagttc	agtggccacc

```

8881 cccacaggat cccaggggct tcagcagatc ccacccctta ccccatgtga gcagctgccc
8941 agtgagctct taggaaccgc agccacattc ccagtgagtt caactgcacc cgggcacggt
9001 ttgctagcac ctcaatggag agctccttgc ttgcagcttt ggcttggtgc acccagcaaa
9061 agcttcctgc caccagtggt ctacagccac acactctcca gcaagattta atctcagcct
9121 tgtgaggagc cctttcccaa atttatcttct ttctgtgttt tttatccctt agtagctaata
9181 ctcatgtttg ccattaataa ctctctatgt taaacccttc cttttgtatc tgcggctaca
9241 ttgatcaatt gtctcacacc gctcaccac ccctctctcc tggatcatga gaggcctcac
9301 cagtcatttt attgctattc ccaggcctct gtgtgcccag atctcttcac tgcctgtca
9361 gttgtgtcct gtccctctct cgacctctct gccttgctct caatgatgtt tctatgaggc
9421 tttggaagc ctcatccaa gactcctggc aactgataca ttagtctcac caacactagc
9481 cctactcct gatctcatt taaaatttta tttcttatt ttattattat ttttttagg
9541 gacatcaccc tgcctctgac tgacccaatt tttaaagtgt ctctttatct tccttaaaga
9601 atggctctcc catttggttc cctcatcttt cttttcactg acttagaatt cagggtccaga
9661 caaaaattcc acttccttga agagccttcc cagtagccat gaaccacact ctggggcaga
9721 gtttggtggt cccaagcact ttgttcacac ctgctcgttc atctttaccc cctcctctca
9781 gaattggttt tgtatgtcag ttccctgctt ggactggaag cccctgtaac ataactagca
9841 tttgaacagt tcataaaaac actttcattt ctattgtcct gtgtaactgt tcacaagata
9901 cattagtctc actcattgtc gtttgacaat gtttattgtt ctaaagagaa agcgagatat
9961 gtaggtagac acaacacaat aagagcctca atacaggcac acactggtgg cagtccaaac
10021 tctgctggaa tatggaaggc cagtgaatag taactagaat cgctgccatc ttttacactg
10081 caattgcaag actgtgtcct atactttaca tgctttatcg gattgacact gcagagaagc
10141 ctttgatgtt ctcggttgga taaacagggt tagaggtagt tgttcaggcc ttctccaagg
10201 tcacacatgt aacagggtga gagccaagac tgcaggctgg tttgtctgac tccagaacct
10261 gtgatacact gaacaaggcc aagagattca gcagtggaga cctcctctct tcttcaggaa
10321 gatagggaac atggtaagag cagtgaattc cataagcatg ggaccccggt atacttcatt
10381 ttttgtaaaa ttagttcctt gatcagaagc aacgcctttg ggtctctcgc tattgagtta
10441 agtggtgatg tgccactctc cctagtacct cagagtgtag ttggaggctt gcctagagat
10501 tagagggtga ggatccttca gtagttccta taccaagcca taagttgtgc tgcactctga
10561 ggtagggtca gggagctccg ctgaacagat gtggaggaca tcagagtggg agggaaaagga
10621 agcaagtcgt gtggggagag aagaccagc ctgcaatgat gactgggtta ctactgttct
10681 ttaccttaata cacactcaga taacagacta agtctag

```

Slika 4: Genska sekvenca SAA1, accession # NG\_021330 z 10717 bp.

**Možnost nahajanja TATA box-a, torej lokacije, običajno oddaljene nekaj deset nukleotidov pred primarnim transkriptom, je poudarjena s svetlo rumeno barvo v ozadju nukleotidov. Pomembna je pri vezavi RNA polimeraze, saj omogoča prepoznavanje začetka transkripcije.**

**Kodirajoca sekvenca** SAA1 je poudarjena s svetlo modro barvo v ozadju nukleotidov, medtem ko pa so nukleotidi, ki sestavljajo eksone še dodatno obarvani z rdečo barvo. Njegova dolžina je 3117 bp in se nahaja od 5001 bp do 8717 bp. mRNA SAA1 sestavljajo štirje ekseni, in sicer, če združimo lokacije od 5001 bp do 5183 bp, od 5624 bp do 5718 bp, od 7935 do 8073 bp in od 8457bp do 8717 bp. Na lokaciji 8073 bp se v tem primeru nahaja nukleotid gvanin (g, zeleno obarvan), ki se za to nukleinsko kislino razlikuje od referenčnega genomskega sestava (GRCh37). C je zamenjan z G -jem da lahko predstavlja standardni alel, določenim z uskladitvijo javnih cDNA-jev.

#### 4.2.1 Lokalizacija gena SAA1 na lokusu 11p15.1 ter okoliški geni

Geni, locirani na istem lokusu, si velikokrat delijo podobne vloge ali pa so vključeni v podobne procese, zato lahko lokalizacija in identifikacija drugih genov na isti lokaciji na

kromosomu nakaže na potencialne vloge SAA1. V bližini Gena SAA1 se na kromosomu 11p15.1 nahajajo tudi geni za sledeče proteine: SAA2, SAA4, GTF2H1, HPS5 in ST13P5 (Slika 3).

#### 4.2.1.1 SAA1

Druga imena za SAA1 so še: Serum Amyloid A1, SAA, PIG4, SAA2, TP53I4, Serum Amyloid A Protein, Serum Amyloid A-1 Protein in Tumor Protein P53 Inducible Protein 4. SAA2 je paralog gena SAA1, saj si delita skupnega prednika. Gen SAA1 se nahaja na pozitivni vijačnici in njegova natančnejša lokalizacija na kromosomu je od 18,287,721 bp do 18,291,524 bp, skupna velikost je 3804 baz (GeneCards).

#### 4.2.1.2 GTF2H1

Druga imena za GTF2H1 so še: General transcription factor IIH, polypeptide 1, General Transcription Factor IIH Subunit 1, P62, TFB1, TFIIH. Gen GTF2H1 kodira protein, povezanim z boleznimi, kot sta Rift Valley Fever in Xeroderma Pigmentosum, Group C. Gen GTF2H1 se nahaja na pozitivni vijačnici in njegova natančnejša lokalizacija na kromosomu je od 18,343,816 bp do 18,388,591 bp, skupna velikost je 44,776 baz (GeneCards).

#### 4.2.1.3 HPS5

Druga imena za HPS5 so še: Hermansky-Pudlak Syndrome 5, Alpha Integrin Binding Protein 63, RU2, AIBP63, KIAA1017. Gen HPS5 kodira protein, ki lahko igra vlogo pri biogenezi organelov, povezano z melanosomi, trombociti gostih granul in lizosomi. Bolezni, povezane s HPS5, vključujejo sindrom Hermansky-pudlak 5 in sindrom Hermansky-Pudlak 6. Gen HPS5 se nahaja na negativni vijačnici in njegova natančnejša lokalizacija na kromosomu je od 18,300,217 bp do 18,343,745 bp, skupna velikost je 43,529 baz (GeneCards).

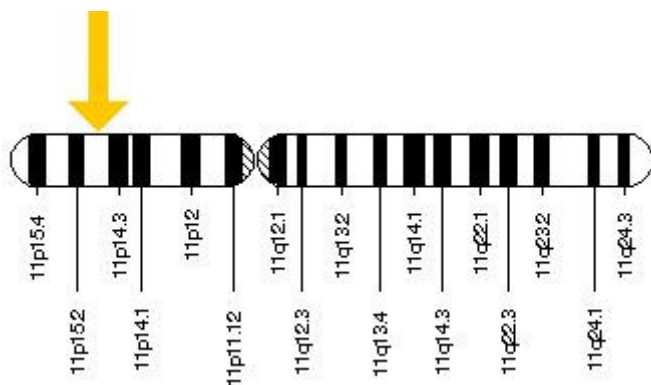


#### 4.2.1.4 ST13P5

Druga imena za ST13P5 so še: Suppression Of Tumorigenicity 13 (Colon Carcinoma) (Hsp70 Interacting Protein) Pseudogen 5, FAM10A5, Family With Sequence Similarity 10, Member A5, Family With Sequence Similarity 10, Member A5 Pseudogene in Suppression Of Tumorigenicity 13 Pseudogene 5. ST13P5 je psevdogen, povezan z boleznimi, kot sta mielom in multipli mielom. Gen ST13P5 se nahaja na pozitivni vijačnici in njegova natančnejša lokalizacija na kromosomu je od 18,283,432 bp do 18,285,048 bp, skupna velikost je 1617 baz (GeneCards).

### 4.3 Gen SAA1

Gen SAA1 vsebuje informacije za izdelavo beljakovine, imenovane serumski amiloid A1. Nahaja se na kratkem kraku (p) kromosoma 11 na položaju 15,1 (Slika 5). Natančneje, gen SAA1 se nahaja na kromosomu 11, od baznega para 18,287,753 do baznega para 18,306,423 (OMIM). RNA vsebuje štiri eksone in tri introne. Ker vsebuje tudi introne pomeni, da to še ni zrela mRNA, ampak je to le primarni transkript.



Slika 5: Kromosom 11 in lokacija gena SAA1 (vir: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SAA1>)

Spletni portal NCBI nudi svoj brskalnik, v katerem se lahko sproži iskanje želene nukleotidne sekvence iskanega gena. Na levi izberemo možnost „nukleotide“, medtem ko v desno polje vpišemo ime ali dostopno (identifikacijsko) številko (accession number) gena. Preden sprožimo iskanje, lahko vzpostavimo različne filtre (kot na primer lahko označimo, da iščemo gen za vrsto *Homo sapiens*), za učinkovitejše iskanje. Nato se pojavi seznam, izmed katerega izberemo iskano zaporedje.

Lastnosti primarnega transkripta SAA1 so predstavljene na spletni strani genske sekvence:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG\\_021330.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NG_021330.1),

Accession number (številka dostopa): NG\_021330, 3717 bp dolg primarni transkript (Slika 6).

```

1  ggccaggacc  cgcagctcag  ctacagcaca  gatcaggtga  ggagcacacc  aaggagtgat
61  ttttaaaact  tactctgttt  tctctttccc  aacaagatta  tcatttcctt  taaaaaaaaa
121 agttatctctg  ggccatacag  ccataccatt  ctgaaggtgt  cttatctcct  ctgatctaga
181 gaggtaagca  gggtcgggcc  tggtagtact  tggatgggag  aacacctggg  aataccaggt
241 gctaaaggct  ttaagaataa  aaaataatga  tcttgctttg  tgtttatccc  atgttgaggt
301 ctgtgcgggg  cagagggaac  acacggtaaa  tgcgttatgg  ggaattatag  gctacttgag
361 ggagtgcag  tctggtggta  actcctgcct  tcctccatca  gtgccacgtt  ggcatcctct
421 tatgcagtca  ggcttcagg  ctgatgggtt  cagaaccgag  ggcttctggc  tctgagtgag
481 gtctgtctgc  aagggttctt  agatgagcca  ctgagactct  aataagatcc  agtggaaata
541 accaggctct  cgtcggaata  taagtcccaa  gggaagctgt  gccagtcttg  tgggcgactg
601 cctgacttct  cctttcattt  cagcaccatg  aagcttctca  cgggcctggg  tttctgctcc
661 ttggctcctg  gtgtcagcag  ccgaagcttc  ttttcgttcc  ttggcgaggc  ttttgatggt
721 aaggcttcag  aagggttgca  ggatttctga  agagaaacat  caccctggac  ctgataaact
781 ggggaaaatg  atgctttcgg  aaggctgctt  ttgaaccaca  gagttgctag  tgtctgcgtt
841 gctgaggcct  gccaggaact  aggggttgct  ggggtgcctg  tctcgagtct  ttcagagctg
901 ctgggaatat  cccctttccc  cgtagtgcag  cttctcagga  tgtgttaagt  ggatggatca
961 catttcagaa  gccgtgcaa  ggtgtatcaa  aaacacatct  cctgagccgt  aaggacggg
1021 gcatccagta  acaacgcaca  cggggtatgt  ttgggcttcc  ttaagatttg  agccgctgcc
1081 ttaggttggt  ctgccaatg  tgcctgggga  gctgctaaac  agattagaga  gtcgaggatt
1141 gttgtcagtt  actcagagaa  agaacaatca  tcctttccag  gagcacctga  gctgtttgtt
1201 ttgctgagaa  gatgcaaaat  aaggcctgca  atgggtataa  aatgtccctc  agcataaatc
1261 gcataggagt  atgactaagg  ctgttgactc  ttctgtcttc  tttctccttc  ctccttcgat
1321 ttctagtgtg  gataatgtac  agggctcttt  agcctcgtc  tgtcaggggc  tcccttctg
1381 gtttggtctg  tttccattct  tccttctcca  gccttcttga  caagagctgg  gaactaacgt
1441 gcctcaagcc  cccacaagga  ccacagcatt  ttctcattta  gtttcagaat  gactctgtga
1501 cgcaatcttc  ctctcttgga  aggtgagaaa  gctgatcttg  gaaggtgaga  aagctgagac
1561 ttagagcagc  tgaagccaat  gccaggagc  ttactgccag  tcagcagggt  gcagggcaga
1621 ggtttgagcc  cggtgtgct  tgaggtcagg  gctcttgcca  ggtagacgca  tcactgacca
1681 cctcctagag  gttgatggtt  atgaatctca  ggcacacctt  ggcatcacct  gaaataacca
1741 tgcttcaac  tcccagcag  agtctgcaga  aactggcctg  ggggtgtggc  tgggcactgg
1801 gactttcagt  ttctctctg  gtgattagaa  agtgacagca  aggtcacgc  ctgtaattcc
1861 agcacttttg  gaggccaagg  tggatgaatc  acttgaggtc  atgagttccg  gagcagcctg
1921 gccaacatgg  tgaaacccc  tctctactaa  aaatactaaa  atgtagccag  gcgtggtggc
1981 aggcacctgt  aatccagct  actcaggagg  ctgaagcacg  agaatacact  gaacccgaga
2041 agcagagggt  gcagtgacta  gagatcgac  cagtgtcctc  caacctgggt  gacagagcga
2101 gactccatct  aaaaaaaatg  aaaaagaaag  tgcagccaag  gcagagcacc  actgccctat
2161 tgcttctcct  agcaaccac  agcatcagta  cagcctacta  agaaagtatt  tagggacttt
2221 tatgtcctca  acagtcactg  gaactcacgt  cacaatgacg  tgtattccat  ttgcaagaat
2281 atatacttta  ggtcgggggt  cggtggctca  cgctgtaat  cccagcactt  tgggaggcca
2341 aggcaggggg  atcacgaggt  caggagttcg  agaccagcct  gaccaacatc  gtgaaatccc
2401 cgtctctact  aaaaaataca  aaattagcca  ggcgtgatgg  cgcagcctg  taatctcagc
2461 tactcaggag  gctgaggcag  aagaatctct  tgaacctggg  aggtggagg  tgcgatgagc
2521 tgagatagca  cactgcact  ccagcctggg  cgacagagca  agactctgtc  taaaaaaaaa
2581 aaaaaaaaaa  aaaaaaaaaa  aaagaatata  aactttagta  gtcagggcag  aagtactctg
2641 tgtctgccac  ctttctcagc  atcagtattc  catgtcacta  cctcattcat  acacactcct
2701 ggatcttatc  ataggcagct  tcattctata  gcagtggctc  ttcaccagg  cacttgaaga
2761 agccaactag  gataaaggaa  tgtgcttctc  aacctatgg  atccaaggct  gctatgatca
2821 caggctgaaa  gcttgaagtc  agtggaaagt  ttgtccttcc  tcattccctc  ctaagggtgt
2881 gttggagtct  ttatgttctc  ctgatgtccc  ttctgccttt  cctttccttt  ccaggggctc
2941 gggacatgtg  gagagcctac  tctgacatga  gagaagccaa  ttacatcggc  tcagacaaat
3001 acttccatgc  tcgggggaac  tatgatgctg  ccaaaagggg  acctgggggt  gcctgggctg
3061 cagaagtgat  caggtaactg  gagctcctgg  gacgttaggg  ctgggtgagc  agagcttgcc
3121 tgcttgggac  agtcaggagg  gagacgagct  ccttggtggg  aagttagagg  ctgcggcccc
3181 tcctcctctt  gccctctctc  tgctctgtgt  ctgagtgtga  ggtctgagtg  gatggttaga
3241 gtgagtgatt  cctcatctc  cctctctggg  tgctgttcat  ccagcctagg  ggtgccagc

```

```

3301 ctggctgaat ggggtggtgc ccagtgtttt catccctcct tccttggcct ttctgggctc
3361 ctctctgagc cctcccttgg aacagggaga atgggagggt gggctattgc tcaactggcct
3421 gattattaat ctcttcttgg cctgccttga ttacagcgat gccagagaga atatccagag
3481 attcttttggc catggtgctg aggactcgct ggctgacag gctgccaatg aatggggcag
3541 gagtggcaaa gacccaatc acttccgacc tgctggcctg cctgagaaat actgagcttc
3601 ctcttctcagc tgctctcagg agatctggct gtgaggccct cagggcaggg atacaaagcg
3661 gggagagggt acacaatggg tatctaataa atacttaaga ggtggaattt gtggaaa

```

Slika 6: Primarni transkript ima skupno štiri eksone, ki sestavljajo kodirajočo sekvenco, oziroma mRNA SAA1. Nukleotidi v eksonih so rdeče obarvani. Prvi ekson poteka od 1 bp do 183 bp, drugi od 624 bp do 718 bp, tretji od 2935 bp do 3073 bp ter četrti od 3457 bp do 3717 bp. Ko te odseke združimo, dobimo kompleten mRNA.

## 4.4 SAA1 mRNA

Messenger RNA (mRNA) je velika družina RNA molekul, ki posredujejo genetske informacije iz DNK na ribosom, kjer se določi aminokislinsko zaporedje proteina.

Iskanje mRNA SAA1 je potekalo po istem postopku kot pri genu.

Lastnosti mRNA SAA1 so predstavljene na spletni strani mRNA sekvence:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M23698.1>,

Accession number (številka dostopa): M23698, 369 bp dolg mRNA zapis (Slika 7).

```

1 atgaagcttc tcacgggcct ggttttctgc tccttggctc tgggtgtcag cagcgaagc
61 ttcttttctg tccttggcga ggcttttctg ggggctcggg acatgtggag agcctactct
121 gacatgagag aagccaatta catcggtcga gacaaatact tccatgctcg ggggaactat
181 gatgctgcca aaaggggacc tgggggtgtc tgggctgcag aagcgatcag cgatgccaga
241 gagaatatcc agagattctt tggccatggt gcggaggact cgctggctga tcaggctgcc
301 aatgaatggg gcaggagtgg caaagacccc aatcacttcc gacctgctgg cctgcctgag
361 aaatactga

```

Slika 7: mRNA, ki sestavlja kodirajočo sekvenco. Na lokaciji od 1 bp do 54 bp se nahaja signalni peptid, katerega nukleotidi so obarvani vijolično.

### 4.4.1 Primerjava treh transkripcijskih variant humane mRNA SAA1

Najdemo lahko tri različne transkripcijske variante, ki so:

- transkripcijska varianta 1 (Slika 8), lastnosti so predstavljene na spletni strani mRNA sekvence: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_000331.4](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000331.4)

Accession number (številka dostopa): NM\_000331

```

1 ggcagggacc cgcagctcag ctacagcaca gatcaggatg ggagcacacc aaggagtgat
61 ttttaaaact tactctgttt tctctttccc aacaagatta tcatttcctt taaaaaaaat

```

```

121 agttatcctg gggcatacag ccataccatt ctgaaggtgt cttatctcct ctgatctaga
181 gagcaccatg aagcttctca cgggcctggt tttctgctcc ttggctcctg gtgtcagcag
241 ccgaagcttc ttttcgttcc ttggcgaggc ttttgatggg gctcgggaca tgtggagagc
301 ctactctgac atgagagaag ccaattacat cggctcagac aaatacttcc atgctcgggg
361 gaactatgat gctgccaaaa ggggacctgg ggggtgcctgg gctgcagaag tgatcagcga
421 tgccagagag aatatccaga gattcttttg ccatgggtgcg gaggactcgc tggctgatca
481 ggctgccaat gaatggggca ggagtggcaa agaccccaat cacttcgcgac ctgctggcct
541 gcctgagaaa tactgagctt cctcttctact ctgctctcag gagatctggc tgtgaggccc
601 tcagggcagg gatacaaagc ggggagaggg tacacaatgg gtatctaata aataacttaag
661 aggtggaatt tgtggaag

```

Slika 8: Transkripcijska varianta 1, 678 bp

- transkripcijska varianta 2 (Slika 9), lastnosti so predstavljene na spletni strani

mRNA sekvence: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_199161.3](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_199161.3)

Accession number (številka dostopa): NM\_199161, 531 bp dolg mRNA zapis

```

1 ggcagggacc cgcagctcag ctacagcaca gatcagcacc atgaagcttc tcacgggcct
61 gggttttctgc tccttgggtcc tgggtgtcag cagccgaagc ttcttttctgt tccttggcga
121 ggctttttgat ggggctcggg acatgtggag agcctactct gacatgagag aagccaatta
181 catcggtctca gacaaatact tccatgctcg ggggaactat gatgctgcca aaaggggacc
241 tgggggtgccc tgggctgcag aagtgatcag cgatgccaga gagaatatcc agagattctt
301 tggccatggt gcgaggact cgctggctga tcaggctgcc aatgaatggg gcaggagtgg
361 caaagacccc aatcacttcc gacctgctgg cctgcctgag aaatactgag cttcctcttc
421 actctgctct caggagatct ggctgtgagg ccctcagggc agggatacaa agcggggaga
481 gggtagacaa tgggtatcta ataaatactt aagaggtgga atttgtggaa a

```

Slika 9: Transkripcijska varianta 2, 531 bp

- transkripcijska varianta 3 (Slika 10), lastnosti so predstavljene na spletni strani

mRNA sekvence: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_001178006.1](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001178006.1)

Accession number (številka dostopa): NM\_001178006, 592 bp dolg mRNA zapis

```

1 ggcagggacc cgcagctcag ctacagcaca gatcagttat cctggggcat acagccatac
61 cattctgaag gtgtcttctc tcctctgata tagagagcac catgaagctt ctcacgggcc
121 tgggttttctg ctccttggtc ctgggtgtca gcagccgaag cttcttttctg ttcttggcgcg
181 aggccttttga tggggctcgg gacatgtgga gagcctactc tgacatgaga gaagccaatt
241 acatcggtctc agacaaatac ttccatgctc gggggaacta tgatgctgcc aaaaggggac
301 ctgggggtgct ctgggctgca gaagtgatca gcgatgccag agagaatatc cagagattct
361 ttggccatgg tgcggaggac tcgctggctg atcaggctgc caatgaatgg ggcaggagtg
421 gcaaagaccc caatcacttc cgacctgctg gcctgcctga gaaatactga gcttcctctt
481 cactctgctc tcaggagatc tggctgtgag gccctcaggg cagggataca aagcggggag
541 agggtagaca atgggtatct aataaatact taagaggtgg aatttgtgga aa

```

Slika 10: Transkripcijska varianta 3, 592 bp

Vse tri transkripcijske variante so različnih dolžin, njihove sekvence pa se popolnoma ujemajo. Ne ujemajo se s sekvenco z accession number M23698, in sicer na dveh pozicijah

(Slika 11).

#### Homo sapiens serum amyloid A1 (SAA1) mRNA, complete cds

Sequence ID: [gb|M23698.1|HUMAMYSA1A](#) Length: 369 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 369 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
671 bits(363)	0.0	367/369(99%)	0/369(0%)	Plus/Plus
Query 188	ATGAAGCTTCTCACGGGCTGGTITTTCTGCTCCTTGGTCCTGGGTGTGTCAGCAGCCGAAGC	247		
Sbjct 1	ATGAAGCTTCTCACGGGCTGGTITTTCTGCTCCTTGGTCCTGGGTGTGTCAGCAGCCGAAGC	60		
Query 248	TTCTTTTCGTTCTTGGCGAGGCTTTTGATGGGGCTCGGGACATGTGGAGAGCCTACTCT	307		
Sbjct 61	TTCTTTTCGTTCTTGGCGAGGCTTTTGATGGGGCTCGGGACATGTGGAGAGCCTACTCT	120		
Query 308	GACATGAGAGAAGCCAATTACATCGGCTCAGACAAATACTTCCATGCTCGGGGGAACAT	367		
Sbjct 121	GACATGAGAGAAGCCAATTACATCGGCTCAGACAAATACTTCCATGCTCGGGGGAACAT	180		
Query 368	GATGCTGCCAAAAGGGGACCTGGGGGTGCCTGGGCTGCAGAAGTGATCAGCGATGCCAGA	427		
Sbjct 181	GATGCTGCCAAAAGGGGACCTGGGGGTGTCTGGGCTGCAGAAGCGATCAGCGATGCCAGA	240		
Query 428	GAGAATATCCAGAGATTCTTTGGCCATGGTGCAGGAGACTCGCTGGCTGATCAGGCTGCC	487		
Sbjct 241	GAGAATATCCAGAGATTCTTTGGCCATGGTGCAGGAGACTCGCTGGCTGATCAGGCTGCC	300		
Query 488	AATGAATGGGGCAGGAGTGGCAAAGACCCCAATCACTTCCGACCTGCTGGCCTGCCTGAG	547		
Sbjct 301	AATGAATGGGGCAGGAGTGGCAAAGACCCCAATCACTTCCGACCTGCTGGCCTGCCTGAG	360		
Query 548	AAATACTGA	556		
Sbjct 361	AAATACTGA	369		

Slika 11: Primerjava humane mRNA SAA1. V zgornji vrstici se nahaja transkripcijska varianta 1 (NM\_000331), v spodnji pa kodirajoča sekvenca SAA1 proteina ( M23698). Razlikujeta se v dveh pozicijah.

## 4.5 Primarna proteinska struktura

Primarna proteinska struktura se nanaša na linearno zaporedje aminokislin v polipeptidni verigi. Primarno strukturo omogočajo kovalentne peptidne vezi. Konca polipeptidne verige se imenujeta karboksilni konec (C-terminalni) in amino konec (N-terminalni). Takšno poimenovanje temelji na naravi proste skupine na vsaki ekstremiteti. Za pridobitev primarne proteinske strukture pa je bilo potrebno izbrati „Protein“ v spustnem meniju, na levi strani spletnega brskalnika.

#### 4.5.1 Tri različice primarne proteinske strukture in njihova medsebojna primerjava

Primerjava treh različic primarne proteinske strukture se nahaja v Tabeli 4.

Tabela 4: Tabela primerjav treh proteinskih struktur

Accession number (številka dostopa) proteinske sekvence	Datum vnosa	Dolžina proteina	Prvi avtor glavne reference
AAA64799	05. april 1995	122 AA	Kluve-Beckerman,B., 1995
AAI05797	03. november 2005	122 AA	Strausberg,R.L., 2005
AAH07022	02. januar 2004	122 AA	Strausberg,R.L., 2004

Z uporabo protein blast-a, se sekvenci AAA64799 in AAI05797 razlikujeta od sekvence AAH07022 za eno aminokislino, in sicer gre za zamenjavo asparagina (AAA64799 in AAI05797) z asparaginsko kislino (AAH07022) na poziciji 101 AA.

.

#### 4.5.2 Primarna proteinska struktura, pridobljena iz sekvenc NG\_021330 in M23698

Dolžina proteina je tako 122 aminokislin. Primarna proteinska struktura je bila pridobljena z uporabo aplikacije na spletni strani <http://web.expasy.org/translate/>. Primerjava je na sliki 12.

##### 4.5.2.1 NG\_021330

Met KLLTGLVFCSLVLGVSSRSFFSFLGEAFD GARD Met WRAYS D Met REAN  
YIGSDKYFHARGNYDAAKRGPGG **A**WAAE **V**ISDARENIQRFFGHGAEDSL  
ADQAANEWGRSGKDPNHFRPAGLPEKY

##### 4.5.2.2 M23698

Met KLLTGLVFCSLVLGVSSRSFFSFLGEAFD GARD Met WRAYS D Met REAN  
YIGSDKYFHARGNYDAAKRGPGG **V**WAAE **A**ISDARENIQRFFGHGAEDSL  
ADQAANEWGRSGKDPNHFRPAGLPEKY



## unnamed protein product

Sequence ID: Icl|10821 Length: 122 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 122 [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
248 bits(634)	2e-90	Compositional matrix adjust.	120/122(98%)	120/122(98%)	0/122(0%)
Query 1	MKLLTGLVFCSLVLGVSSRSFFSFLGEAFDGARDMWRAYSMDREANYIGSDKYFHARGNY				60
Sbjct 1	MKLLTGLVFCSLVLGVSSRSFFSFLGEAFDGARDMWRAYSMDREANYIGSDKYFHARGNY				60
Query 61	DAAKRGPGGAWAAEISDARENIQRFFGHGAEDSLADQAANEWGRSGKDPNHFRPAGLPE				120
Sbjct 61	DAAKRGPGG WAAE ISDARENIQRFFGHGAEDSLADQAANEWGRSGKDPNHFRPAGLPE				120
Query 121	KY 122				
Sbjct 121	KY 122				

Slika 12: Zaradi sprememb v nukleotidnem zaporedju zgornjih sekvenc, nastane sprememba tudi pri primarni proteinski strukturi, in sicer različni sta sedemdeseta in petinsedemdeseta aminokislina. Pri prvem proteinu, pridobljenemu iz NG\_021330, se na sedemdesetem mestu nahaja alanin, na petinsedemdesetem mestu pa valin. Pri proteinu, pridobljenem iz M23698, pa se zgodi obratno. Tako kot alanin kot valin sta obe nepolarni aminokislini.

### 4.5.3 Primarna proteinska struktura, pridobljena iz AAA64799

Lastnosti primarne proteinske strukture SAA1:

Spletna stran zaporedja aminokislin: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/AAA64799>

Accession number(številka dostopa): AAA64799 (Slika 13)

Dolžina: 122 AA ( $122 \times 3 = 366 \text{ bp} + 3 \text{ bp (STOP kodon)} = 369 \text{ bp}$ )

```

1 mklltglvfc slvlgvssrs ffsflgeafd gardmwrays dmreanyigs dkyfhargny
61 daakrgpggv waaaisdar eniqrrffghg aedsladqaa newgrsgkdp nhfrpaglpe
121 ky

```

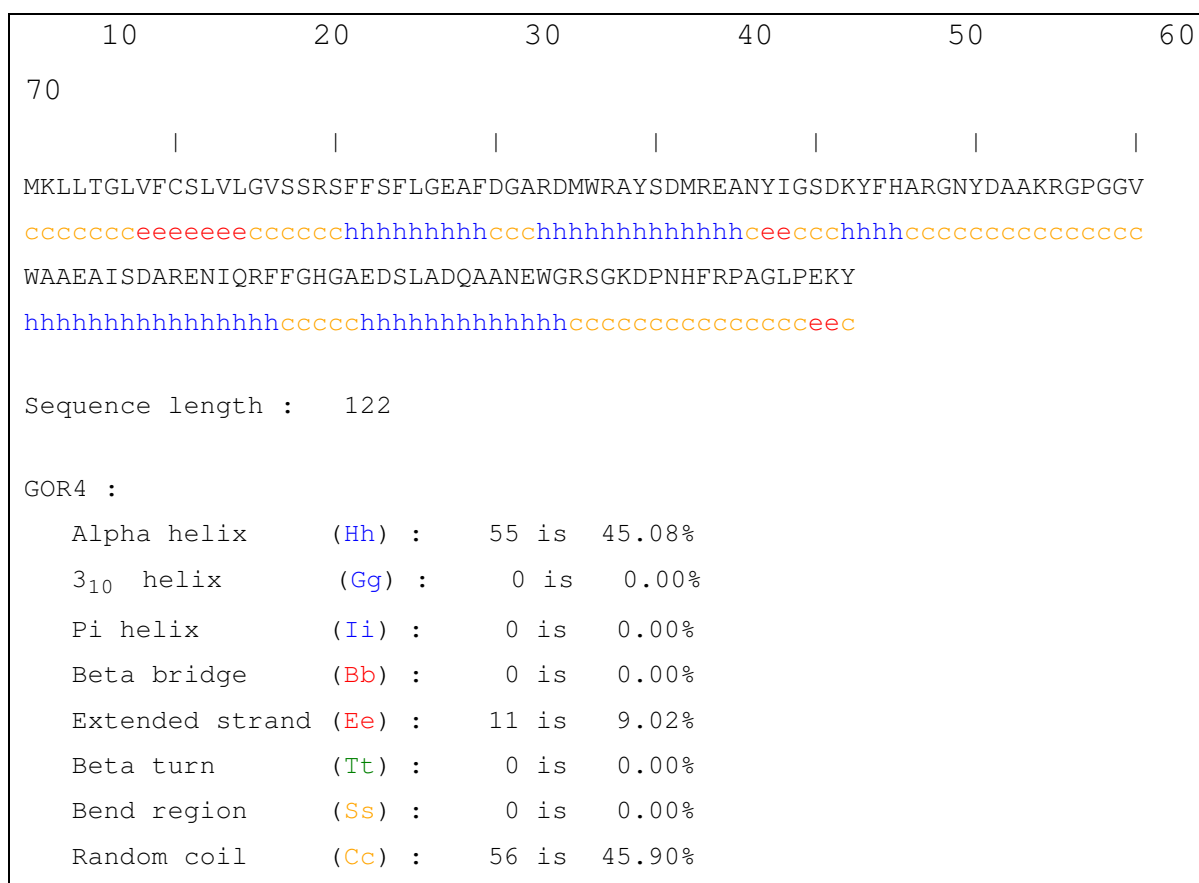
Slika 13: Primarna proteinska struktura SAA1

## 4.6 Sekundarna proteinska struktura

Dve glavni vrsti sekundarne strukture sta  $\alpha$ -helix (alfa vijačnica) in  $\beta$ -sheets (beta plastna struktura). Te sekundarne strukture stabilizirajo vodikove vezi, ki se vzpostavijo med amino skupinami ene peptidne vezi in karboksilnimi skupinami druge peptidne vezi. SAA proteini igrajo veliko, vendar relativno neznano vlogo pri odzivu akutne faze in so pomembni sestavni del prirojenega imunskega sistema tako pri ljudeh kot najverjetneje pri vseh vretenčarjih. N-terminalni fragmenti SAA1 in SAA2 so glavne sestavine vlaken, ki nastanejo med sekundarno ali reaktivno amiloidozo. Poleg sekundarne strukturne, je o

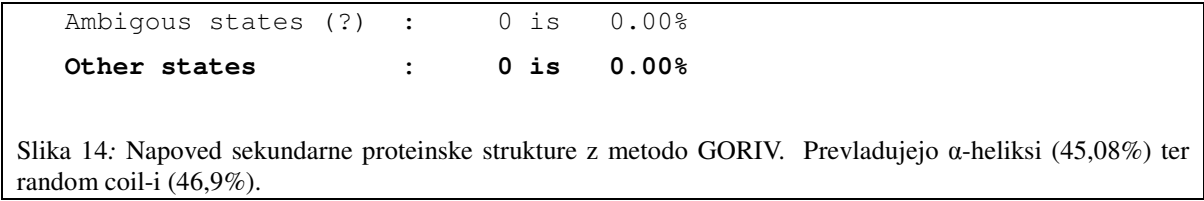
strukturi SAA malo znanega. Analiza primarne strukture človeškega SAA kaže na možno homologijo z N-terminalno domeno hemocianina<sup>1</sup> členonožcev in kaže, da je lahko približno 80% molekule sestavljena iz vijačnega snopa, preostali C-terminalni del pa je potencialno neurejen. Ta model SAA kaže, da so predlagana vezavna mesta za laminin, fibronektin in kalcij ločena na eni ploskvi molekule in da vezavno mesto za heparin/heparan najdemo na domnevno neurejeni regiji proteina. Protein očitno opravlja več funkcij, vendar pa je malo znanega o specifičnih aktivnosti SAA poleg verjetne vloge pri transportu holesterola, njegove strukture ali odnosa takšne strukture do tipične nagnjenosti N-terminalnega fragmenta dolžine 76 aminokislin, da tvori fibrile. Pomen fragmentacije je lahko povezan z notranjo stabilnostjo vsakega SAA proteina [36]. Uporabili smo 3 različne metode za ovrednotenje sekundarne strukture SAA1 in sicer GORIV, PSIPRED in PORTER (Slike 14-16).

#### 4.6.1 Metoda GORIV (Garnier J. et al., 1996)

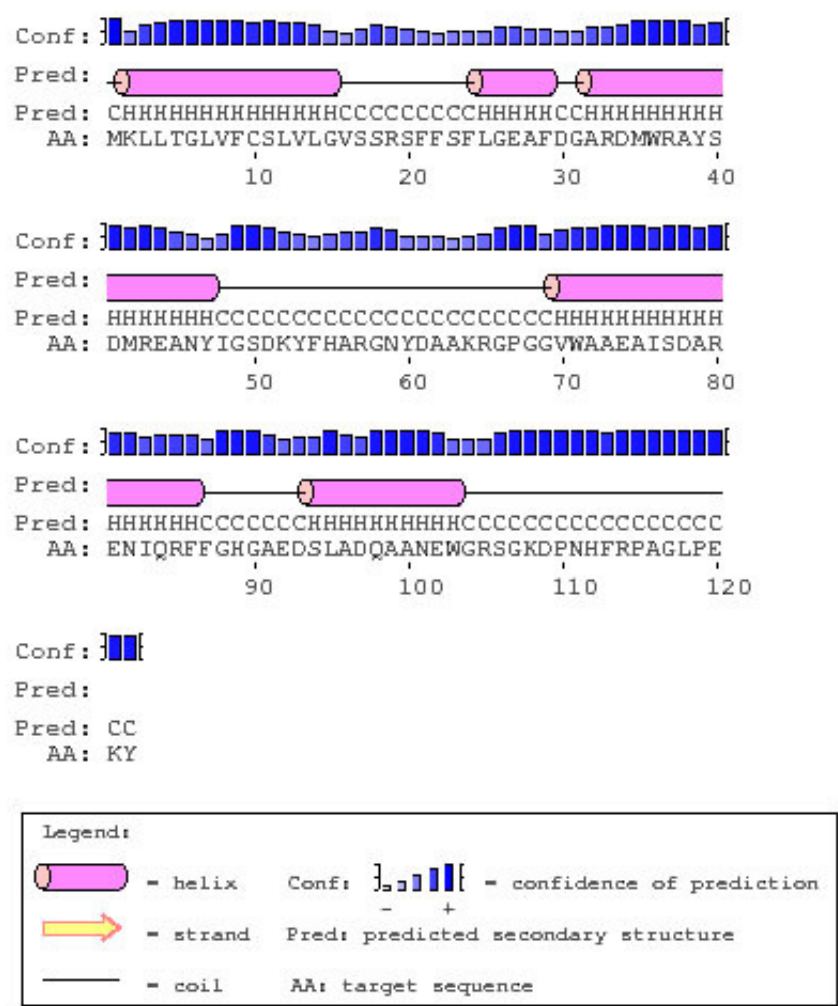


<sup>1</sup> Hemocianini so dihalni (respiratorni) pigmenti v obliki metaloproteina iz več podenot, na katerih sta vezana dva bakrova iona za reverzibilno vezavo ene kisikove molekule.





4.6.2 PSIPRED Protein Sequence Analysis Workbench (Buchan D. W. A. et al., 2013)



Slika 15: Napoved sekundarne proteinske strukture z metodo PSIPRED. Prevladujejo  $\alpha$ -heliksi (50,82%) ter random coil-i (49,18%).

### 4.6.3 PORTER (Pollastri G. et al., 2005)

Subject: Porter response to SAA1

Query name: SAA1

Query length: 122

Prediction:

[illegible]

DAAKRGPGGVWAAEAISDARENIQRFFGHGAEDSLADQAANEWGRSGKDPNHFR  
 PAGLPE  
 HHHHCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCCCCHHHHHHHHHHHHHCCCCCCCC  
 CCCCCCCC

KY  
CC

H – helix  
C – coil

H = 76 (62,3%)  
C = 46 (37,7%)

Slika 16: Napoved sekundarne proteinske strukture z metodo Porter. Prevladujejo  $\alpha$ -heliksi (62,3%) ter random coil-i (37,7%).

Čeprav se rezultati v vseh treh primerih nekoliko razlikujejo, alfa heliksi očitno prevladujejo. Nikjer ni zaslediti strukture  $\beta$ -sheets, medtem ko pa lahko v vseh treh izračunih najdemo random coil-e. Ti rezultati nakazujejo na terciarno strukturo, zgrajeno iz štirih večjih vijačnih snopov.

Alfa vijačnica ( $\alpha$ -heliks) je pogosta sekundarna struktura proteinov in je desno navita ali spiralne konformacije (helix), v kateri vsaka N-H skupina donira vodikovo vez C = O skupini. Med vrstami lokalnih struktur proteinov, je  $\alpha$ -vijačnica najpogostejša in najbolj predvidljiva iz zaporedja, kot tudi najbolj razširjena.  $\alpha$  -vijačnica je tesno pakirana; v spirali skoraj ni prostora. Vijačnice, opažene pri beljakovinah, lahko obsegajo od štiri do več kot štirideset aminokislin, vendar tipičen  $\alpha$ -heliks vsebuje približno deset aminokislin

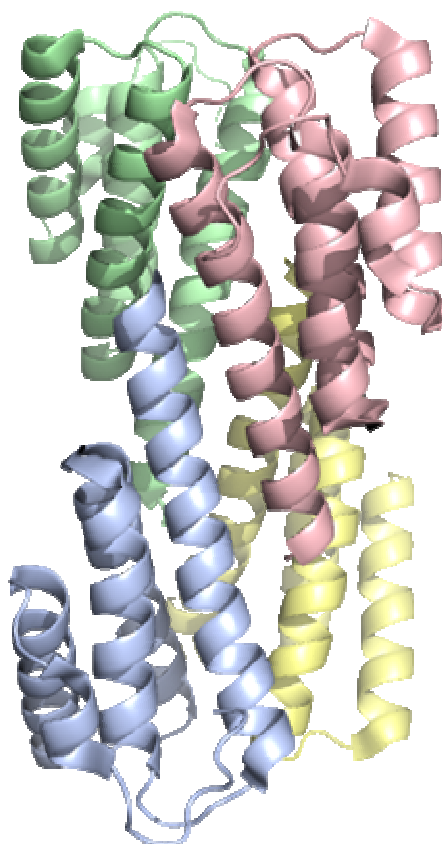
(približno tri zavoje). Na splošno kratki polipeptidi v raztopini ne kažejo veliko alfa-vijačnic v strukturi, saj entropični stroški, povezani s prepogibanjem polipeptidne verige, ne kompenzirajo z zadostno količino stabilizacijskih interakcij. Na splošno so vodikove vezi  $\alpha$ -vijačnic nekoliko šibkejše kot tiste, ki so v  $\beta$ -listih, kar omogoča hiter napad nanje s strani vodnih molekul iz okolice. Vendar pa v hidrofobnih okoljih, kot je na primer plazemska membrana, ali v prisotnosti pomožnih topil, se oligopeptidi zlahka zvijejo v stabilno  $\alpha$ -vijačno strukturo. Poleg tega so lahko v peptide vključene križne povezave, da konformacijsko stabilizirajo spiralne pregibe. Križne povezave stabilizirajo spiralno stanje z entropično destabilizacijo neprepognjenega stanja in z odstranitvijo entalpično stabilizarnih pregibov, ki konkurirajo s polnim spiralnim stanjem. Različne sekvence aminokislin imajo različna nagnjenja k tvorbi  $\alpha$ - heliksne strukture. Metionin, alanin, levcin, nenabit glutamat in lizin, vsi imajo posebej visoko nagnjenje k oblikovanju heliksne strukture, v nasprotju s prolinom in glicinom, ki nista nagnjeni k oblikovanju v spirale. Prolin bodisi zlomi ali prepogni vijačnico, oboje zato, ker ne more darovati amidne vodikove vezi (nima amidnega vodika) in tudi zato, ker stranska veriga te aminokislinske sterično posega v hrbtenico prejšnjega zavoja. Vendar se prolin pogosto pojavlja kot prvi ostanek vijačnice, in predvideva se, da je to zaradi njegove strukturne togosti. Kot druga skrajnost, glicin se prav tako nagiba k motenju vijačnice, ker njegova visoko fleksibilna konformacija je entropično potratna, da bi se lahko zvila v  $\alpha$ -vijačno strukturo.  $\alpha$ -vijačnice so tudi najpogostejši proteinski strukturni elementi, ki prestopijo skozi biološke membrane, in predvideva se da zato, ker vijačna struktura ne pušča polarnih skupin, da bi bile izpostavljene membrani, če so stranske verige hidrofobne [2]. Kjer ni alfa-vijačnic, se nahajajo random coil-i (naključne tuljave). Random coil je konformacija polimera. Monomerne podenote so usmerjene naključno, medtem ko so še vedno vezane na sosednje enote. To ni določena oblika, vendar statistična porazdelitev za oblike za verig. Za segmente proteinov in polipeptidov, ki nimajo sekundarne strukture, se pogosto domneva, da kažejo konformacijo random coil-a, v kateri je edino fiksno stanje združitve sosednjih aminokislinskih ostankov s peptidno vezjo. V resnici ni tako enostavno, saj je takšen skupek energetsko obtežen zaradi interakcije med aminokislinskimi stranskimi verigami z manjšo energetsko konformacijo. Poleg tega, tudi poljubna aminokislinska zaporedja imajo ponavadi nekaj vodikovih vezi in sekundarne strukture. Iz tega razloga ima izraz "statistična tuljava" (angl. statistical coil) prednostno uporabo. Konformacijske entropije, povezane s stanjem random coil-a, bistveno prispevajo k energični stabilizaciji verige in

predstavljajo velik del ovire pri tvorjenju terciarne strukture proteinov [28].

## 4.7 Terciarna proteinska struktura

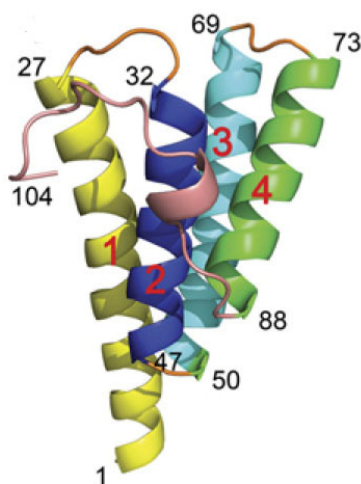
Terciarna struktura se nanaša na tridimenzionalno strukturo enojno, dvojno ali trojno vezane proteinske molekule. Alfa vijačnice in beta plastne strukture se zložijo v kompaktno globularne strukture.

Z dostopom do genske banke (podatkovne baze) na bioinformatičnem portalu NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) se z vpisom imena iskanega proteina (v tem primeru SAA1) v brskalnik pojavi seznam rezultatov. Ob kliku na prvi rezultat SAA1 z ID:6288, ki ustreza človeškemu serumskemu amiloidu A1, se na desni strani prikaže meni, kjer se pod naslovom „Links to other resources,“ oziroma povezave do drugih virov, nahaja povezava na KEGG stran. Na tej spletni strani najdemo različne informacije o SAA1, med drugim tudi terciarno strukturo (Slika 17).



Slika 17: Terciarna proteinska struktura proteina SAA1. Na sliki so vezani štirje proteini SAA1, vsak prikazan z drugačno barvo.

Izvirni SAA1 obstaja kot heksamer s podenotami, ki prikazujejo edinstveni zavoj štiri-vijačnega snopa, stabiliziranega s pomočjo dolgega C-terminalnega repa (Slika 18). Mutacijske študije, ki temeljijo na strukturi, so pokazale prisotnost dveh pozitivnih nabojev, enega v bližini središča, drugega blizu konice heksamera, ki sta vključena v povezavo proteina SAA s heparinom. Vezava HDL vključuje samo vrhovno regijo SAA in je lahko inhibirana s heparinom. Analize formacije peptidnih amiloidov so opredelile N-terminalna heliksa 1 in 3 kot amiloidogenska peptida SAA1. Oba peptida sta ločena v heksamerični strukturi SAA1, kar kaže, da je izvirni SAA ne patogeni. Poleg tega se zdi, da disociacija heksamera SAA ne zadostuje za sprožitev amiloidogeneskega prehoda in proteolitično cepitev ali odstranitev C-terminalnega repa SAA. Monomer SAA1 je štiri-vijačni snop, z orientiranostjo heliksov navzgor-navzdol-navzgor-navzdol. Je strukturno različen od citokinov, vendar podoben N-terminalni domeni apolipoproteina E (apoE), le položaja heliksov 3 in 4 sta zamenjana. Za razliko od drugih spiralnih snopov, heliksni snop SAA1 ima obliko stožca, z N-koncema vijačnic 1 in 3 in C-koncema vijačnic 2 in 4, ki držijo tesno skupaj. C-terminalni rep je dobro razvrščen in ovije se okoli ene ploskve snopa, pri čemer tvori večkratne solne mostove in vodikove vezi s tremi od štirih  $\alpha$ -heliksov. Obsežno konzervirane interakcije med C-terminalnim repom in heliksi proteina SAA1 kažejo na to, da je funkcija repa stabilizacija strukture vijačnega snopa SAA1. V serumu se SAA1 običajno povezuje s HDL. Mesto vezave HDL na SAA in njegovo sproščanje med patogenim nastajanjem AA amiloida ostajajo nejasne. Mutacija ali krajšanje vijačnice 1 povzroči izgubo vezave HDL, kar kaže, da je N-konec vključen pri vezavi HDL. Vezava SAA s HDL je prikazana kot odvisna od naboja. Obstajata dve območji pozitivno nabitih površin na SAA, eno se nahaja v bližini pore osrednjega heksamera, drugo na vrhu vsakega trimera. Mutacije alanina na dveh nabitih območjih so pokazale, da le-ta prispevajo k vezavi heparina [24].



Slika 18: Monomerna struktura SAA1 prikazuje edinstveni antiparalelni štiri-heliksni zavoj snopa. Trakovna predstavitev kristalne strukture človeškega SAA1.1 z  $\alpha$ -heliksi 1 (obarvan z rumeno), 2 (obarvan z modro), 3 (obarvan z modro-zeleno), in 4 (obarvan z zeleno) in C-terminalni rep (peščeno obarvan). Vir: Lu j. et al., 2014.

V terciarni strukturi SAA1 ni disulfidnih vezi [34].

## 4.8 Ontologija gena

Ontologija gena skuša združiti različne že obstoječe opise značilnosti določenih genov. Ontologija gena SAA1 je bila pridobljena z dostopom preko genske banke na spletnem portalu NCBI, z uporabo podatkovne baze Gene in je bila opravljena preko Uni-Prot GOA, baze podatkov anotacije ontologije.

### 4.8.1 Interakcije SAA1 z drugimi proteini

SAA1 se veže na kolagene (COL4A1, COL4A2, COL4A3 in COL4A4) [3], na receptor FPRL-1 /ALX [37], LAMA1 [3] in VIMP [41].

LAMA1 ali laminin, alpha 1 je protein in domneva se, da se laminin veže na celice prek receptorja z veliko afiniteto in posreduje vezavo, migracije in organizacijo celic v tkiva v času razvoja zarodka, preko stika z drugimi komponentami izvenceličnega matriksa (GeneCards).

VIMP ali VCP-Interacting Membrane Protein je protein, ključen v proces razgradnje luminalnih beljakovin nepravilno zgubane endoplazemskega retikuluma (ER) (GeneCards).

SAA uporablja FPRL1, transmembranski receptor sedmih zavojev, vezan na G-protein, izražen na fagocitih kot kemotaktični receptor, kar podpira predhodne ugotovitve, da je SAA močan kemoatrktant in aktivator človeških monocitov periferne krvi in nevtrofilcev. Izražanje tega receptorja je zelo inducibilno v epitelnih celicah s strani posebnih citokinov. Človeški T limfociti periferne krvi so bili inducirani s strani SAA, da se selijo in se držijo endotelijskih enoslojnih kultur celic, kar kaže, da obstaja možnost, da lahko tudi limfociti T izražajo receptor(je) za SAA. Koncentracijske ravni SAA, ki so potrebne za aktivacijo FPRL1, dosegajo približno iste nivoje, ki so potrebni za aktivacijo drugih celic. Pri normalnih pogojih, se večina serumskega SAA poveže s HDL, ki deluje kot naravni inhibitor kemotaktične aktivnosti SAA. Ker pa SAA veže HDL pri ekvimolskih razmerah, lahko hitro povečanje koncentracije lokalno pridelane SAA vzpostavi gradient prostega aktivnega SAA s posledičnim priklicem levkocitov na vnetna mesta. Zato obstaja možnost, da na lokalnih vnetnih mestih lahko povišane koncentracijske ravni SAA pritegnejo in aktivirajo levkocite z namenom odstranitve povzročiteljev bolezni. Ta proces lahko povzroči tudi poškodbe tkiva. Poleg tega bi lahko signali, ki jih sproži aktivirani FPRL1 (kot funkcionalni receptor SAA), sčasoma povzročili neodzivnost levkocitov na dodatne stimulacije z imobilizacijo celic in omejevanjem stopnje vnetja [37].

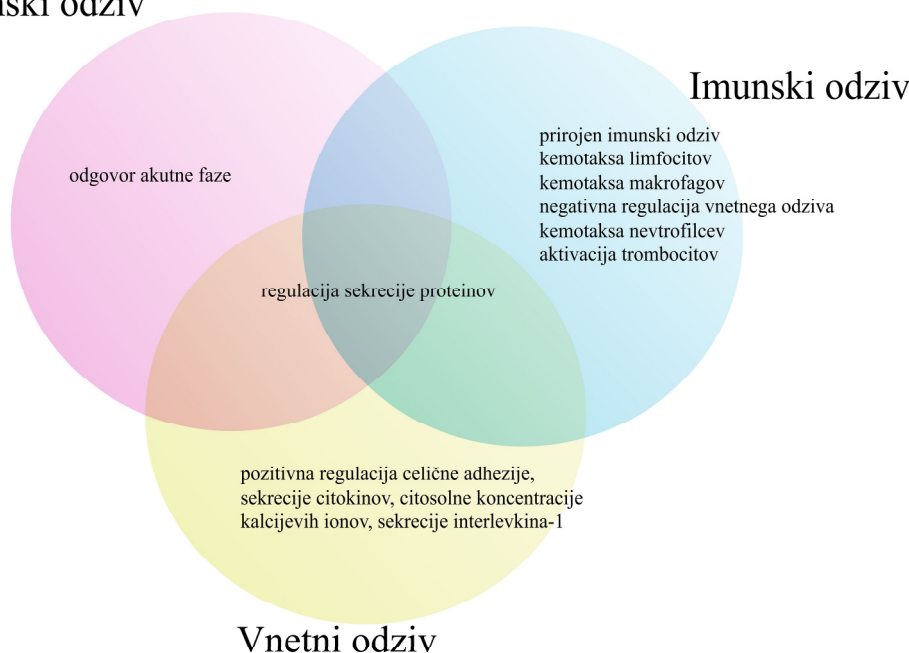
Očitne so interakcije s kolagenskimi proteini, kar mogoče nakazuje na še ne raziskano vlogo proteina SAA1 pri celjenju ran in/ali morebitnem razvoju fibroze. Ugotovljeno je bilo, da popravilo in regeneracija sta ključna postopka pri vzdrževanju tkiva in morebitne motnje le-teh lahko privedejo do bolezenskih stanj. Malo je znanega o molekularnih mehanizmih, ki poudarjajo popravilo in obnovo prebavnega trakta. Morske kumare *Holothuria glaberrima* predstavljajo odličen model za seciranje in karakterizacijo molekularnih dogodkov črevesne regeneracije [29]. Morske kumare imajo neverjetno sposobnost obnavljanja različnih telesnih organov po autotomiji ali odstranitvi notranjih organov. Večkratna poravnava proteina SAA morske kumare z več zaporedji različnih vrst vretenčarjev, kaže visoko strukturno ohranjenost, zlasti v osrednjem delu proteina, na položaju 55 - 77, kjer je 95% aminokislin identičnih. Ta osrednji del je lahko odgovoren za zdaj še neidentificirano biološko funkcijo in vsebuje epitope, povezane z adhezijo ekstracelularnega matriksa. Ti epitopi lahko posredujejo vezavo beljakovin SAA z različnimi komponentami ekstracelularnega matriksa, kot sta laminin in vitronektin. N-terminalni del proteina je manj evolucijsko ohranjen, čeprav je znano, da ta del vsebuje

pretežno hidrofobne aminokisline. Ta amfipatična regija morda igra potrebno vlogo pri modulaciji transporta holesterola, saj domneva se, da je odgovorna za vezavo SAA na delce HDL [31]. Zaradi visoke stopnje strukturne ohranjenosti ima morda tudi človeški SAA1 pomembno vlogo pri obnovi tkiva, še posebej pri tkivu prebavnega trakta.

#### 4.8.2 Vključenost SAA1 v različne fiziološke procese

SAA1 je vključen v številne procese, katere delimo v tri glavne skupine: sistemski, vnetni in imunski odziv. Slednje je pridobljeno iz podatkovne baze Gene (NCBI), s pomočjo GOA (Slika 19).

##### Sistemski odziv



Slika 19: Imunski in vnetni odziv sta zgolj lokalna procesa, saj se odziv večinoma sproži na mestu poškodbe. Pod procese, v katere je vpleten SAA1, je včasih težko omejiti le na en odziv, saj so ti procesi precej kompleksni in prepleteni med seboj.

#### 4.8.3 Izvor in lokalizacija SAA1

SAA1 se lahko sintetizira na različnih lokacijah:



- Subcelularna lokalizacija SAA1, sinteza poteka izven jeter (ekstrahepatična), torej v različnih tkivih (endocitni lumen vezikla, ekstracelularna regija, zunanjecelični vezikularni eksosom). Sinteza se običajno sproži kot lokalni odziv.
- Lokalizacija v cirkulatornem, krvnem sistemu, sinteza poteka v jetrih. Veže se na lipoproteine visoke gostote (HDL). Sinteza se običajno sproži kot sistemski odziv.

#### 4.8.3.1 TargetP (Emanuelsson O. et al., 2000)

Z uporabo bioinformatičnega orodja TargetP smo ugotovili, da je SAA1 sekretorni protein (Slika 20).

```
### targetp v1.1 prediction results #####
Number of query sequences: 1
Cleavage site predictions not included.
Using NON-PLANT networks.
```

Name	Len	mTP	SP	other	Loc	RC
Sequence	122	0.123	0.907	0.030	S	2
cutoff		0.000	0.000	0.000		

Slika 20: Analiza primarne proteinske strukture proteina SAA1 z uporabo orodja TargetP. Pod zaznamkom „Loc“ je napoved lokalizacije, ki temelji na izračunih uporabljenega orodja. Pri proteinu SAA1 je vrednost S, kar pomeni, da je SAA1 sekretorni protein, torej ga celice izločajo in vsebuje signalni peptid.

Sekretorni protein je katerikoli protein, ki se izloča iz celice. Sinteza proteinov poteka v endoplazemskemu retikulumu (ER). Produkcija sekretornega proteina se začne kot produkcija kateregakoli drugega proteina. mRNA se najprej proizvede v jedru in nato prenese v citosol, kjer interagira s prostim citosolnim ribosomom. N-terminalni del se proizvaja prvi in vsebuje signalno sekvenco, ki sestoji iz 6 do 12 aminokislin s hidrofobnimi stranskimi verigami. To zaporedje prepozna določena citosolna beljakovina, ki ustavi translacijo in pripomore k prevozu kompleksa mRNA in ribosoma do receptorja na membrani endoplazemskega retikuluma. Ko protein prispe na ER, se signalna sekvenca odstrani in translacija se nadaljuje. Ko je tvorba proteina končana, se poveže z več drugimi proteini in s tem pridobi svojo končno obliko. Membranski proteini s funkcionalnimi površinami na citosolni strani, tako vezikla kot celične membrane poskrbijo, da se vezikel združi z membrano. Membrana vezikla se zlije s celično membrano in tako protein zapusti celico [33].

#### 4.8.3.2 SOSUI (Hirokawa T. et al., 1998)

Analiza z uporabo bioinformatičnega orodja SOSUI je pokazala, da SAA1 vsebuje enojni transmembranski  $\alpha$ -heliks (Slika 21), kar pomeni, da je to bitopni membranski protein.

No.	N terminal	transmembrane region	C terminal	type	length
1	1	MKLLTGLVFCSLVLGVSSRSFFS	23	PRIMARY	23

Slika 21: Analiza primarne proteinske strukture proteina SAA1 z uporabo orodja SOSUI. SOSUI prepozna to zaporedje kot pripadajoče membranskemu proteinu. Heliks, dolžine triindvajsetih aminokislin, ki obsega prve tri aminokisline, je transmembranski heliks.

Transmembranski protein je vrsta membranskega proteina, ki prečka celično membrano, na katero je trajno pritrjen. Transmembranski proteini se raztezajo od ene strani membrane na drugo stran membrane [39].

Topologijo bitopnega membranskega proteina sestavlja ena transmembranska vijačnica, ki prečka lipidni dvosloj samo enkrat. V nasprotju z vijačnicami politopnih proteinov, so transmembranske vijačnice bitopnih proteinov sprva šteli zgolj kot hidrofobna sidra, medtem ko novejšje študije predlagajo vlogo pri proteinski funkciji. Transmembranske domene bitopnih proteinov so povprečno precej bolj ohranjene kot preostanek proteina, celo ob upoštevanju njihovega manjšega aminokislinskega repertoarja. Izkazalo se je, da pride do pomembnih interakcij med proteini, ko je vsaj eden izmed njih transmembranski heliks bitopnega proteina. Vzorec ohranjenosti kaže na vijačno periodičnost in s tem opozarja na vlogo konzerviranega motiva pri interakcijah med proteini. Iz tega sledi, da so transmembranske vijačnice bitopnih membranskih proteinov pomemben sestavni del beljakovin. Ohranjanje transmembranskih segmentov ni samo posledica manjšega aminokislinskega repertoarja ali katere koli druge fizične ovire lipidnega dvosloja. Nasprotno pa je bolj verjetno, da je to zaradi "nujnosti" interagiranja transmembranskih vijačnic z drugo skupino v ravnini lipidnega dvosloja. Natančneje, takšne interakcije bi potrebovale ohranjenost le ene strani vijačnice, kakor velja za transmembranske vijačnice [42].

## 5 RAZPRAVA

Poleg jeter, ki so glavno mesto sinteze SAA, je bilo izražanje SAA dokazano tudi v mnogih različnih tkivih in tipih celic zunaj jeter, med drugim v epiteljskih tkivih, monocitih, makrofagih, limfocitih in endotelijskih celicah. Največja indukcija SAA se pojavi ob kombinirani aktivaciji citokinov interleukina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in interleukina-6 (IL-6), ki vodijo do sinergističnega povišanja koncentracije SAA. Poleg sodelovanja v akutni fazi odziva, je bilo ugotovljeno, da SAA1 deluje kot citokin / kemokin [20], kateri ima sposobnost, da stimulira ekspresijo encimov, ki razkrajajo matriks, kot so kolagenaze in metaloproteinaze v matriksu, igra pomembno vlogo pri presnovi HDL holesterola s spodbujanjem celičnega iztoka le-tega [6, 20], saj med akutno faznim odzivom, lahko SAA1 in SAA2 prehodno predstavljajo kar 80% vseh HDL proteinov in izpodrinejo glavno sestavino beljakovin HDL, apolipoproteina A-I. To dejstvo, skupaj z ugotovitvijo, da obstaja specifična vezava holesterola z akutno faznim SAA kaže na to, da lahko SAA za časno spremeni transport holesterola med celicami in plazmo v času akutno faznega odziva [23].

Izražanje in izločanje jetrnega proteina SAA1/SAA2 s strani makrofagov, stimuliranih z lipopolisaharidi, kaže na vlogo SAA tudi pri lokalnem odzivu na poškodbe in vnetja. Vztrajno visoka koncentracija SAA1 pri kroničnih vnetjih kaže, da je SAA1 pomemben pokazatelj stanja bolezni [20].

### 5.1 Regulacija akutno faznih sprememb

#### 5.1.1 Indukcija proteinov akutne faze s strani citokinov in drugih zunajceličnih molekul

Citokini so polipeptidi za medcelično signalizacijo, ki jih aktivirajo celice. Večina citokinov ima več izvorov, več tarč, in več funkcij. Citokini, ki se proizvajajo med vnetjem in sodelujejo pri vnetnih procesih, so glavni stimulatorji za proizvodnjo proteinov akutne faze. Vključujejo mnogo proteinov, med katerimi so interleukin-6, interleukin-1 $\beta$ , dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , transformacijski rastni faktor  $\beta$  in kemokin interleukin-8 [11]. Proizvajajo jih različne vrste celic, med drugim tudi adipociti [6], vendar so njihov najpomembnejši izvor makrofagi in monociti na vnetnih mestih. Glavni spodbujevalec

proizvodnje večine proteinov akutne faze je interlevkin-6, medtem ko ostali vpleteni citokini vplivajo na različne podskupine beljakovin akutne faze. Vendar pa je vloga interlevkina-6 pri stimulaciji tvorjenja proteinov akutne faze odvisna od narave ali mesta vnetnega dražljaja; odziv je v veliki meri inhibiran pri miškah, katerim je bil vbrizgan terpentin, vendar pa je odziv normalen, če je razlog za začetni vnetni dražljaj bakterijski lipopolisaharid. Ta ugotovitev kaže, da lipopolisaharidi povzročajo nastajanje drugih citokinov, ki lahko stimulirajo produkcijo proteinov akutne faze. Pri interlevkinu-1 $\beta$  so odgovori podobni, domnevno zato, ker je po vnosu terpentina interlevkin-1 $\beta$  potreben pri spodbujanju proizvodnje interlevkina-6. Dokazano je, da se vzorci proizvodnje citokinov in akutni odziv razlikujejo pri različnih vnetij. Citokini delujejo tako kot kaskade, prav tako pa kot omrežja pri stimulaciji produkcije proteinov akutne faze. Številni citokini lahko uravnavajo proizvodnjo drugih citokinov in citokinskih receptorjev. Na primer, dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$  je glavni spodbujevalec proizvodnje interlevkina-1 pri bolnikih z revmatoidnim artritisom; interlevkin-1 $\beta$  lahko poveča ali zmanjša ekspresijo svojih receptorjev; odziv interlevkina-6 na injiciranje terpentina pri miših zahteva interlevkin-1 $\beta$ ; in interlevkin-6 inhibira ekspresijo dejavnika tumorske nekroze  $\alpha$ . Poleg tega pa citokini povzročajo kompleksno znotrajcelično signalno aktivacijo. Celice so najverjetneje zelo poredko izpostavljene samo enemu citokinu. Namesto tega, različne kombinacije mediatorjev posredujejo biološko relevantne informacije. Učinke citokinov na tarčnih celicah lahko drugi citokini, hormoni, antagonisti citokinskih receptorjev in cirkulatorni receptorji zavirajo ali izboljšajo. Ugotovljeno je bilo, da imajo kombinacije citokinov lahko aditivne, inhibitorne ali sinergijske učinke. Indukcija C-reaktivnega proteina in serumskega amiloida A v nekaterih modelih zahteva tako interlevkin-6 kot interlevkin-1 ali dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$ . Glukokortikoidi običajno krepijo stimulativen učinek citokinov pri proizvodnji proteinov akutne faze, medtem ko insulin zmanjša njihov vpliv na proizvodnjo nekaterih beljakovin akutne faze [11]. Veliko bolezni, predvsem vnetne narave (kot so RA, vnetne bolezni črevesja in sistemski lupus eritematosus), je v splošnem mogoče zdraviti z glukokortikoidi [20]. To so skupina steroidnih hormonov, ki se nahaja v zunanjem delu nadledvične žleze. Delujejo na metabolizem ogljikovih hidratov (kot tudi na metabolizem lipidov in proteinov) in zmanjšujejo vnetne in imunske odzive [14]. Prav tako se nekatere vrste raka zdravijo z glukokortikoidi. Tudi bolniki s presajenimi organi prejemajo glukokortikoide za preprečevanje zavračanja transplantata. Po drugi strani pa obstaja veliko genov, ki se ne odziva na glukokortikoide. Superdružina genov SAA je še

posebej zanimiva v zvezi z odzivnostjo na glukokortikoide. SAA1 se nanje odziva tako *in vivo* kot *in vitro*, kar povzroča povečanje transkripcije RNA pri SAA1 proteinu. SAA2 pa, kljub veliki sekvenčni podobnosti z SAA1, ne kaže odziva nanje. Nekatere vrste celic (npr. HepG2, celice hepatocelularnega karcinoma) zahtevajo prisotnost citokinov (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ), kateri povzročajo vnetja. Le-ti nato inducirajo transkripcijo SAA1 in SAA2, kar omogoča naknadno ali sočasno glukokortikoidno-odvisno krepitev transkripcije gena SAA1, ne pa tudi SAA2 gena [20]. Ekspresija genov beljakovin akutne faze je torej urejena predvsem na transkripcijski ravni, vendar post-transkripcijski mehanizmi prav tako sodelujejo. Post-translacijske spremembe nastopijo med različnimi stadiji vnetja pri glikozilaciji plazemskih proteinov (npr. spremembe oligosaharidnega razvejanja). Citokini, povezani z vnetjem, inducirajo spremembe oligosaharidnega razvejanja, neodvisno od učinkov, ki jih imajo na proizvodnjo proteinov akutne faze [11].

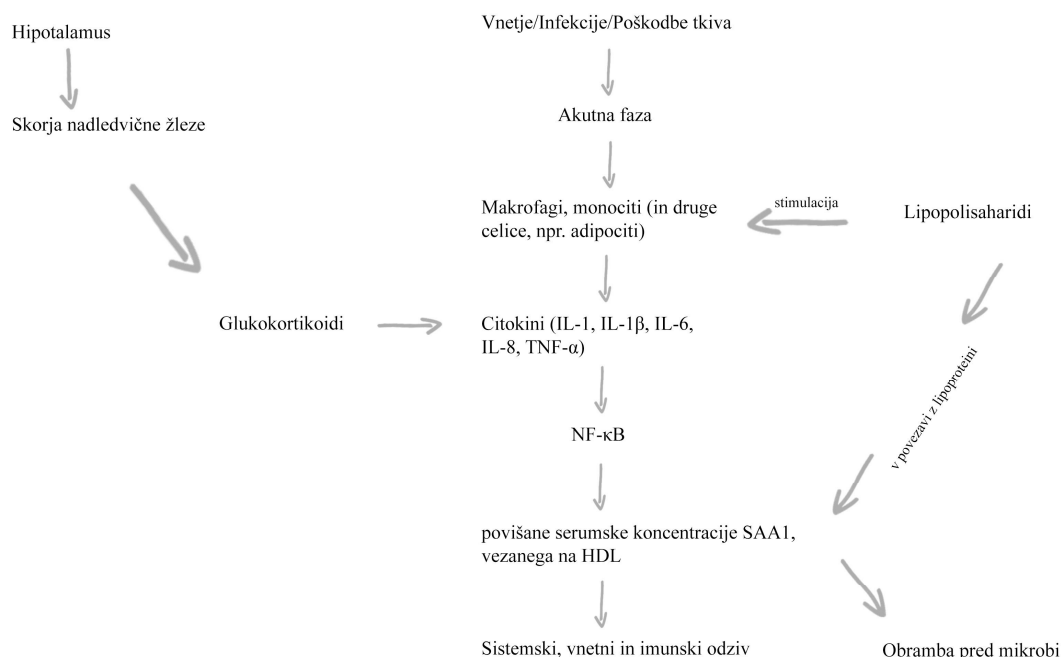
### **5.1.2 Regulacija genov akutno-faznega Seruma amiloida A s strani dejavnika tumorske nekroze $\alpha$ , interleukina-6 in glukokortikoidov v človeških jetrnih in epitelijskih celičnih linijah**

Različni vnetni dražljaji, vključno s citokini in glukokortikoidi, regulirajo enega izmed glavnih akutno faznih proteinov, seruma amiloida A (kateri se hitro in močno sproži v odziv na infekcije ali poškodbe). Povečane sistemske koncentracije obeh, SAA in dejavnika tumorske nekroze (TNF)- $\alpha$ , so značilnost vnetnih bolezni, kot so revmatoidni artritis in vnetne črevesne bolezni. Človeški SAA je večinoma produkt dveh genov, SAA1 in SAA2 (SAA1/2), ki sta več kot 90% identična na promotorsko proksimalnih regijah, kodirajočih zaporedjih in neprevedenih regijah. Oba gena sta regulirana s strani citokinov, interleukinom (IL)-1 in IL-6. Do nedavnega je obstajalo prepričanje, da so človeški geni SAA usklajeno regulirani. Zvišane koncentracije SAA so tudi pomemben laboratorijski parameter pomemben za diagnostiko vnetnih bolezni, kot sta revmatoidni artritis in vnetno črevesna bolezen. Prav tako je dokazano, da obstaja bistvena korelacija med visoko koncentracijo SAA in visoko koncentracijo TNF- $\alpha$  v serumih med sepsa. Trajno sistemsko povišane vrednosti SAA lahko privedejo do sekundarne amiloidoze, ki je napredujoča bolezen s smrtnim izidom, pri kateri se AA amiloidna vlakna odlagajo v glavnih organih, kot so ledvica in v končni fazi povzročijo njihovo okvaro. Predlagane so bile številne funkcije SAA v odgovor na vnetni dražljaj na celičnem nivoju. SAA lahko povzroči

kemotakso monocitov in nevtrofilcev, ekspresijo matričnih metaloproteaz in sproščanje IL-8, kar kaže na morebitno vlogo SAA pri preoblikovanju tkiva. Sistemsko lahko SAA izriva ApoAI od koristnega holesterola (HDL), s čimer se poveča afiniteta HDL delcev za makrofage in po možnosti spodbuja popravila tkiva. Nedavno je bilo pokazano, da je SAA sposoben tvorbe membranskih kanalov, kar skupaj z njegovo ekspresijo povzroči lizo bakterijskih celic, kar kaže na to, da bi SAA lahko deloval kot antimikrobno sredstvo [38]. Nedavno so poročali, da SAA1/2 sicer ni vplival na rast ali viabilnost uropatogenih *E. coli*, vendar je vplival na nastanek njihovega biofilma [10].

Glukokortikoidi se običajno uporabljajo pri zdravljenju revmatoidnega artritis, vnetne črevesne bolezni in mnogih drugih vnetnih bolezni. Ti izvajajo svoje protivnetne učinke z uporabo več mehanizmov, kateri vključujejo znižanje izražanja vnetnih citokinov. Paradoksalno, glukokortikoidi povečajo izražanje vseh SAA beljakovin [38]. Nedavno je bilo dokazano, da glukokortikoidi povečajo transkripcijsko aktivacijo SAA1, vendar ne SAA2 s strani citokinov IL-1 in IL-6 v HepG2 hepatomskih celicah in KB epitelijskih celicah [10]. TNF- $\alpha$  ima prav tako vlogo v patogenezi vnetnih bolezni ter je vpleten tudi pri regulaciji SAA v jetrnih in epitelijskih celicah. Transkripcija SAA1 in SAA2 v HepG2 celicah se zmerno poveča z IL-1 $\beta$ , bolj skromno z IL-6 in se sinergično poveča z IL-1 $\beta$  skupaj z IL-6. V HepG2 celicah, promotor SAA2 se odziva na TNF- $\alpha$  na podoben način kot na IL-1 $\beta$ , vendar odziv promotorja SAA1 na TNF- $\alpha$  ni bil poročan. Med odzivom akutne faze, sproščanje citokinov TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  in IL-6, so predmet različnih časovnih omejitev. Pri podganjih mikroglijalnih celicah, stimuliranih z lipopolisaharidi, se najprej sprosti TNF- $\alpha$  v 1 uri, po treh urah sledi IL-1 in nazadnje, po šestih urah, IL-6. Šteje se, da je večina v krvi krožeče SAA beljakovine, jetrnega izvora. V poskusni miški je model akutno-faznega odziva pokazal, da se lahko sinteza mRNA SAA proteina v jetrih popolnoma prekine z istočasnim vbrizgavanjem receptorskega antagonista IL-1 in kazeinskega dražljaja. Vendar pa se lahko zazna nizke ravni inducirane SAA beljakovine v serumu, kar dokazuje, da med akutno-faznim odzivom obstaja nekaj zunaj-jetrne ekspresije SAA proteina, ki je neodvisen od IL-1. Te ugotovitve kažejo, da bi preiskava zunaj-jetrne regulacije SAA s strani drugih vnetnih modulatorjev, kot so TNF- $\alpha$ , IL-6 in glukokortikoidov, lahko prispevala k razumevanju indukcije akutno-faznih beljakovin med vnetjem. Za kronične vnetne bolezni je značilna *de novo* sinteza vnetnih citokinov, kot so TNF- $\alpha$  in IL-1, ki so ohranjeni na neobičajno visokih ravneh tudi dolgoročno. Različne študije, ki uporabljajo citokinske antagoniste in tarčne genske inhibitorje („disruptors“) so

pokazale, da imajo ti citokini nekoliko različne vloge pri revmatoidnem artritisu, kjer je IL-1 bolj vključen pri uničevanju sklepov in TNF- $\alpha$  bolj vključen pri infiltraciji makrofagov. TNF- $\alpha$  regulira SAA na podoben način kot IL-1 $\beta$ . Indukcija promotorja SAA1 s strani IL-1 $\beta$  v KB celicah je odvisna od transkripcijskega faktorja jedrnega faktorja –  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Ker znotrajcelične signalne poti za IL-1 in TNF- $\alpha$  konvergirata in pripeljeta do aktivacije NF- $\kappa$ B, je zelo verjetno, da je ta transkripcijski faktor, s strani TNF- $\alpha$ , odgovoren za indukcijo promotorjev SAA. Medtem, ko se zdi, da imata TNF- $\alpha$  in IL-1 $\beta$  večji vpliv na regulacijo promotorjev SAA pri hepatomskih celicah kot pa pri epitelijskih celicah, glukokortikoidi nedvomno igrajo vidnejšo in bolj zapleteno diferenciacijsko vlogo pri regulaciji SAA v epitelijskih celicah. Poleg tega, glukokortikoidi lahko v KB celicah inducirajo SAA1, vendar ne SAA2. Zgornje ugotovitve lahko kažejo na to, da imata proteina SAA1 in SAA2 različne funkcije v epitelu, ali pa, da si beljakovini delita skupno delovanje, vendar razlike v regulaciji zagotavljajo "generično" raven izražanja, kjer je vsaka od obeh beljakovin primerna in prilagojena na različna vnetna stanja, ki se razlikujejo v etiologiji. Medtem, ko so dolgoročne zvišane sistemske koncentracije SAA jasno povezane s povečanim tveganjem za sekundarno amiloidozo, takšno tveganje ni bilo dokazano pri trajnostnem lokalnem izražanju SAA pri relativni odsotnosti sistemske beljakovine [38]. Shematičen prikaz regulacije ekspresije proteina SAA1 je na Sliki 22.



Slika 22: Shema okvirnega prikaza poteka regulacije proteinske ekspresije SAA1. Adaptacija iz [40]

### 5.1.3 Regulacija drugih akutnih sprememb s strani vnetnih citokinov

Povišana telesna temperatura je predstavnik nevroendokrinih sprememb, ki so značilne za akutno reakcijo. Čeprav lahko več citokinov povzroči vročino, je interleukin-6, proizveden v možganskem deblu, potreben pri končnih fazah, ki vodijo do povišane telesne temperature. Vendar citokini niso edini spodbujevalci vročine. Druge nevroendokrine spremembe odražajo kompleksne interakcije med citokini, kot na primer os hipotalamus-hipofiza-nadledvična žleza, in drugi sestavni deli nevroendokrinskega sistema. Na primer, citokini, povezani z vnetjem, spodbujajo proizvodnjo kortikotropin-sproščujočega hormona (CRH), s posledično stimulacijo kortikotropina in proizvodnjo kortizola, pa tudi neposredno spodbujajo nadledvične žleze. Stimulacija proizvodnje arginin-vazopresina z interleukinom-6 lahko pojasni hiponatremijo, ki se pojavi pri nekaterih motnjah vnetja. Citokini povzročajo tudi vedenjske spremembe, vključno z anoreksijo, zaspanostjo in letargijo, ki pogosto spremljajo vnetja. Kaže, da trombocitozo vnetja povzroča interleukin-6. Kaheksija, izguba telesne teže, ki se pojavi pri hudih kroničnih vnetnih boleznih, je



posledica zmanjšanja skeletnih mišic, maščobnega tkiva in kostne mase. Interlevkin-1 $\beta$ , interlevkin-6, dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$  in interferon  $\gamma$  prispevajo k tem procesom. Interlevkin-6 povečuje proizvodnjo metalotioneina (beljakovina, ki veže kovine), s posledično povečavo vezanja cinka in hipocinkemijo. Interlevkin-1 $\beta$  in dejavnik tumorske nekroze  $\alpha$  zmanjšata izražanje receptorjev rastnega hormona na hepatocitih, s posledično zmanjšano odzivnostjo na rastni hormon in nizkimi plazemskimi koncentracijami inzulinu podobnega rastnega faktorja I. Ugotovitve kažejo, da povečana proizvodnja citokinov, povezanih z vnetjem, lahko vsaj delno pojasni motnje rasti pri otrocih s kroničnimi vnetji [11].

## **5.2 Serumski amiloid A aktivno sodeluje pri zaviranju vstopa virusa hepatitisa C v sistemu celične kulture**

Virus hepatitisa C (VHC) je eden izmed glavnih vzrokov kronične bolezni jeter. Bolezni jeter, povezane z VHC, pogosto napredujejo v cirozo in karcinom jetrnih celic. Cepiva za preprečevanje okužbe s HCV ni, in trenutne terapije so učinkovite le pri delu bolnikov. Poleg tega današnja zdravila pacienti pogosto slabo prenašajo. Z vplivom na zgodnjo stopnjo virusnega življenjskega cikla, SAA, v odvisnosti od odmerka, zavira okužbo z VHC. Ob vstopu virusa SAA interagira z virusnimi delci in s tem aktivno deluje proti VHC. Pri določenih pogojih HDL modulira protivirusno delovanje SAA, kar kaže na tesen odnos med SAA in HDL pri moduliranju okužbe z VHC. Iz analize SAA v serumu bolnikov s kronično okužbo z VHC je razvidna prisotnost različnih nivojev koncentracije SAA z nenormalno povišanimi koncentracijami le v nekaterih primerih. To kaže, da lahko zaviralni učinek SAA vpliva na vstop VHC. Pričakovati bi bilo, da SAA inhibira učinek, ki ga ima HDL ob vstopu VHC. Po drugi strani, je SAA apolipoprotein in ne moremo izključiti, da bi se delež SAA vezal na HDL, kar bi zmanjšalo inhibični učinek SAA na infektivnost VHC. Poleg tega SAA, ki je povezan s HDL, morda ne zmore omiliti HDL-posredovane olajšave vstopa VHC. Vendar pa, ko je bil pred okužbo ob prisotnosti HDL, VHC predhodno inkubiran z SAA, je protein ohranil svoj protivirusni učinek, kar kaže, da SAA aktivno deluje proti VHC, če naleti na delce VHC preden pride v stik s HDL, saj protivirusno delovanje SAA se lahko zmanjša ob prisotnosti HDL v človeškem serumu. Ker pa sta protein SAA in VHC proizvedeni v hepatocitih je verjetno, da ima SAA

možnost, da pride najprej v stik z VHC, kot pa s HDL. Analize SAA v serumih bolnikov s kroničnim VHC kažejo na prisotnost različnih nivojev koncentracij SAA, z nenormalno povišanimi koncentracijami v nekaterih primerih. Vendar pa klinična korelacija med nivoji koncentracij SAA in virusnim bremenom VHC ni bila opažena. To kaže, da SAA ne igra pomembne vloge pri nadzoru virusne infekcije pri kronično okuženih pacientih. Vendar pa ni mogoče izključiti vloge SAA med akutno fazo pri infekciji z VHC, verjetno v povezavi z drugimi dejavniki [22].

Natančna vloga SAA pri obrambi gostitelja med vnetnim stanjem je še vedno slabo raziskana. SAA lahko igra vlogo pri obrambi gostitelja tako, da je vključen v presnovo maščob. Povezava SAA s HDL nakazuje, da lahko ta protein igra vlogo pri uravnavanju povratnega transporta holesterola HDL, s spodbujanjem odstranjevanja holesterola iz območij poškodovanega tkiva. Ker se lahko SAA veže na holesterol, je bilo predlagano, da bi lahko SAA pospeševal dostavo celic holesterola med popraviлом tkiva. Opazovanja, da se SAA veže na VHC in ima protivirusno aktivnost proti temu virusu, zagotavljajo eksperimentalne dokaze, da ima lahko SAA neposreden učinek proti patogenom. Ta ugotovitev je v prid vlogi SAA pri prirojenem imunskem odzivu proti VHC. Vendar pa je protivirusna aktivnost SAA verjetno omejena na VHC ali na določeno število virusov. Kakršnokoli protivirusno delovanje pri več drugih virusih ni bilo odkrito. Možnost, da bi lahko interakcija med SAA in VHC bila rezultat adaptativnega razvoja tega virusa, in tako zmanjša svojo kužnost v okolju jeter, ne more biti izključena. To bi lahko zmanjšalo patogenost VHC in hkrati ohranilo zdrave pogoje gostitelja za daljši čas [22].

### **5.3 Serum amiloid A se veže na protein A zunanje membrane Gram-negativnih bakterij in deluje kot prirojen imunski opsonin**

Raziskano je bilo, da se SAA veže na širok spekter Gram-negativnih bakterij, vključno z *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *Vibrio cholerae* in *Pseudomonas aeruginosa*, vendar ne na *Burkholderia cepacia* ali Gram-pozitivne organizme, kot sta *Streptococcus pneumoniae* in *Staphylococcus aureus*. Ugotovljeno je bilo, da vezava poteka hitro in z veliko afiniteto. Ta reaktivnost ni inhibirana s strani lipoproteina z visoko gostoto (HDL), s katerim je SAA običajno v

serumu. Ker se SAA veže na ligand v bakterijskih lizatih, je bilo mogoče bakterije razcepiti in odkriti največjega liganda, najdenega pri reakciji na zunanji membrani, kateri opravlja vlogo proteina zunanje membrane pri *E. Coli* [11, 34]. Kadar je bil ligand prisoten, je bil vezan tako pri bakterijskih preparatih, kot tudi v lizatskih preparatih. Masna spektrometrija je pokazala, da je to protein zunanje membrane A (OmpA). Ta protein najdemo v skoraj vseh Gram-negativnih bakterijah [16].

SAA1 se močno veže na različne gram-negativne bakterije v suspenziji, vključno z *E. coli*, *S. typhimurium*, *Shigella flexneri*, *P. aeruginosa*, in *K. pneumoniae*. Nasprotno pa je vezava šibkejša na gram pozitivnih organizmih kot sta *S. pneumoniae* ali *Staphylococcus aureus* kot tudi pri nekaterih Gram-negativnih organizmih, kot *B. cepacia*. Veže se tudi na druge Gram-negativne bakterije, kot *Serratia marcescens* in *V. Cholerae*. Afiniteta vezave SAA se spreminja glede na bakterije. *E. coli* in *V. cholerae* imata navidezno večjo afiniteto kot nekatere druge bakterije, kot na primer *P. aeruginosa*. Koncentracija SAA, ki je potrebna za polovico maksimalne vezave, je bila v fiziološko normalnih nivojih, kar kaže, da ni potrebno doseganje ravni akutne faze. SAA kroži v HDL in prisotnost HDL ni bistveno zmanjšala vezavo SAA na *P. aeruginosa*. Kot nadaljnji dokaz, da je OmpA res ligand, ki se veže na SAA, se na različico *E. Coli*, ki tega liganda nima, SAA ne veže. OmpA, na katerega se najverjetneje veže SAA, je izražen tudi pri *S. Typhimurium*, *V. cholerae* in *K. pneumoniae*. Mnoge druge gram-negativne bakterije nimajo proteina OmpA, ampak homologne proteine. Pri *P. aeruginosa* je homolog OprF in ugotovljeno je bilo, da se pri isti vrsti bakterij, ki pa zaradi mutacije nimajo proteina OprF, SAA ne veže. Torej SAA se ne veže na bakterije brez OmpA, kar kaže, da je ta protein glavno vezavno mesto na teh bakterijah [16].

Družina OmpA/OprF je skupina evolucijsko ohranjenih proteinov med gram-negativnimi bakterijami iz družine Enterobacteriaceae; proteine, ki so povezani s to družino, najdemo v skoraj vseh Gram-negativnih bakterijah. Vključeni so v vzdrževanje strukturne celovitosti membrane in verjetno tudi porinske dejavnosti. C-terminalna regija je zelo evolucijsko ohranjena, kot tudi transmembranska regija N-terminalne domene. Domneva se, da so zunanje zanke zelo mobilne in se raztezajo preko zunanje membrane in da so zelo variabilne znotraj družine Enterobacteriaceae. Ker je bilo ugotovljeno, da obstaja 100.000 kopij proteina OmpA na bakterijo, se lahko prav tako zgodi, da se SAA veže na C-

terminalno regijo [16].

Ker je družina OmpA beljakovin prisotna pri skoraj vseh Gram-negativnih bakterijah, lahko to predstavlja potencialni molekularni vzorec, povezan s patogenimi organizmi, kjer ima protein SAA vlogo prepoznavanja tega vzorca. SAA deluje kot opsonin za makrofage in nevtrofilce. Poleg spodbujanja fagocitoze, opsonizacija s strani SAA tudi okrepi respiratorni burst nevtrofilcev, makrofagni TNF- $\alpha$  in proizvodnjo IL-10. Študija o izločanju SAA je pokazala, da SAA v normalnem človeškem serumu, v prisotnosti humoralnega odziva, prispeva k skupni opsonični dejavnosti le v manjši meri. To določa, da je SAA prirojena imunska beljakovina. SAA, kot odziv na *E. coli*, povzroča znatno povečanje TNF- $\alpha$  in IL-10. Za primerjavo, kontrolne bakterije (*S. pneumoniae* in *B. cepacia*), na katere se SAA ne veže, niso pokazale povečanega odziva. Sam SAA ne sproži nobenega odziva TNF- $\alpha$ , čeprav povzroča minimalen odziv IL-10, ki se sproži pri višjih koncentracijah SAA. Ob dodajanju SAA se poveča sproščanje makrofagnih citokinov, ki presega odziv na bakterije same. Proizvodnja citokinov, kot odgovor na *P. aeruginosa*, se z dodajanjem SAA bistveno poveča. Kljub temu, da je TNF- $\alpha$  vnetni citokin, IL-10 pa protivnetni, je pri aktivaciji makrofagov značilno povišanje koncentracije obeh. SAA se ne veže samo na številne gram negativne bakterije, ampak, ko pride do tega, lahko povzroči številne odzive makrofagov in nevtrofilcev, ki so odgovorni za hiter napad patogenih bakterij [34].

Okužbe sečil (UTIs) običajno povzročajo sevi uropatogene *Escherichia coli* (UPEC) in se pogosto pojavljajo pri sicer zdravih posameznikih, izmed katerih jih veliko izkusi ponavljajoče se okužbe kljub uporabi antibiotikov. Ob vstopu v sečila, se sevi uropatogene *Escherichia coli* soočajo z obrambno bariero gostitelja. Kljub neprijaznemu okolju, ki pogosto vključuje prisotnost antibiotikov, se uropatogena *E. coli* pogosto ustali znotraj gostitelja, razmnožuje in ostane za nekaj dni ali mesecev. Vztrajnost uropatogene *E. coli* v mehurju je deloma pripisati sposobnosti teh patogenov za vdor v urotelijske celice, kjer se lahko bodisi množijo, tvorijo biofilme ali pa vzpostavijo latentne rezervoarje, ki lahko na koncu pripeljejo do epizod ponavljajočih ali recidivnih okužb sečil. Sposobnost vdora v gostiteljske celice in tvorba biofilmov nekaterih sevov *E. coli* je kritično odvisna od OmpA [10].

Pri merjenju z encimskoimunskim testom (ELISA), so se ekspresijski nivoji SAA1/2, kot

odziv na okužbe sečil, povišale za več kot 4,8-krat v jetrih in uroteliju in za več kot 30-krat v steni mehurja [10]. V urotelijskih celicah se SAA1/2 nahaja predvsem v citosolu, kjer močno sodeluje z lokalizirano internalizirano uropatogeno *E. coli*. Ravni SAA3 v obtoku so se povišale šele po intraperitonealni inokulaciji uropatogene *E. coli*. V *in vitro* preskusih, fiziološko ustrezna raven SAA1/2 ni vplivala na rast ali preživetje uropatogene *E. coli*, vendar je lahko blokirala nastanek biofilma uropatogenov. Uropatogena *E. coli* je odporna na baktericidne in bakteriostatične učinke proteina SAA, čeprav lahko ta protein akutne faze učinkovito zavira nastanek biofilma, ki ga tvorijo te bakterije. To pomeni, da SAA lahko vplivala na patogenezo okužb sečil z vezavo na OmpA, saj je OmpA pomemben pospeševalec nastanka biofilma, ki ga tvorijo različni tipi *E. coli*. Tvorba biofilma, tako na kot v uroepiteliju, spodbujajo ustanavljanje in obstojnost sevov uropatogene *E. coli* v sečilih [10].

Kot je razvidno z imunofluorescentno mikroskopijo, okužba z uropatogeno *E. coli* povzroči visoke koncentracije citoplazemske SAA v primerjavi z ekspresijo SAA v neokuženih urotelijskih celicah [10]. Primerjave med nivoji koncentracije SAA v steni mehurja in v uroepiteliju kažejo, da so infiltrirane imunske efektorske celice in rezidenčne gostiteljske celice v tem predelu primarni spodbujevalci pri proizvodnji SAA med vzpostavljeno okužbo sečil. Tudi koncentracijske ravni izraženega SAA1 v jetrih in prehodno v serumu okuženih miši so se povišale v odgovor na uropatogeno *E. coli* v sečilih. Pri neposredni inokulaciji uropatogene *E. coli* v potrebušnico so se koncentracijske ravni SAA1 in SAA3 povečale tako v jetrih kot v krvnem obtoku, a samo koncentracija SAA3 se je povišala v steni mehurja in uroepiteliju [10].

V nasprotju s temi protimikrobnimi učinki, lahko SAA v nekaterih primerih škoduje gostitelju. Na primer, SAA lahko inhibira lokalne vnetne odzive na *Actinobacter baumannii pneumonia* (gram-negativna bakterija in povzročiteljica bolezni, ki je pogosto odporna na mnoge antibiotike), in tako olajšuje, ne pa zavira preživetje bakterije [10].

#### **5.4 Serumski amiloid kot aktivator protimikrobnih funkcij: indukcija degranulacije, fagocitoze in krepitev obrambe proti *Candida albicans***

Ob pojavu mikrobnih infekcij, vnetni citokini aktivirajo hepatocite, kateri izločajo velike količine akutno-faznih proteinov, vključno z SAA. SAA inducira kemotakso polimorfonuklearnih celic (PMN), monocitov in limfocitov T in spodbuja njihovo adhezijo na endotelijske monosloje. PMN predstavljajo bistveni del obrambnega mehanizma gostitelja pred mikrobnimi okužbami in izraža specifična vezavna mesta za SAA. Za povišane koncentracije PMN je značilna visoka koncentracijska raven SAA. Stimulacija PMN z rekombinantnim SAA (rSAA) se odraža v hitrem in prehodnem povečanju koncentracije kalcija v celici in regulaciji ekspresije antigenov na površini celic, vključenih v adhezijo in prepoznavanju mikrobov. Stimulacija PMN s strani rSAA poveča izločanje laktoferina, protimikrobnega proteina, katerega najdemo v posebnih granulah PMN in izboljšuje njihovo fagocitno aktivnost proti *Candida albicans*. Aktivacija PMN s strani rSAA krepi svojo dejavnost proti *Candidi* v roku tridesetih minutah po stimulaciji. Ti rezultati kažejo, da je SAA vključen v regulacijo protimikrobnih aktivnosti PMN. Visoke koncentracije SAA v obtoku, značilne za odziv akutne faze, lahko predstavljajo potencialni obrambni mehanizem gostitelja proti glivičnim okužbam [4].

## 6 ZAKLJUČEK

1. Akutno fazni odgovor je kompleksni odgovor telesa na vdor mikrobov, poškodbe in sterilno vnetje. Vključuje imunske in vnetne reakcije na sistemskem, celičnem in molekularnem nivoju, ki skupno delujejo zaščitno, odstranjujejo infekte ter privedejo do celjenja ran.
2. SAA1 igra pomembno vlogo v akutni fazi in je glavni protein akutne faze pri človeku.
3. SAA1 gen je lociran na kromosomu 11p15, kjer so locirani še SAA2, SAA4, ST13P5, GTF2H1 in HPS5. SAA2 je vključen v podobne procese kakor SAA1, SAA4 je konstitutivno izražen in vključen v »housekeeping« funkcije, ST13P5 pa je psevdogen, povezan z boleznimi, kot sta mielom in multipli mielom, GTF2H1 kodira protein, povezanim z boleznimi, kot sta Rift Valley Fever in Xeroderma Pigmentosum, Group C, HPS5 pa kodira protein, ki lahko igra vlogo pri biogenezi organelov.
4. Struktura SAA1 gena je značilna za družino SAA izotipov in sestoji iz 4 eksonov in 3 intronov. SAA1 mRNA sekvenca je dolga 369 bp, najdene so 3 transkriptne različice.
5. Humani SAA1 je 122 aminokislin dolg protein, s štirimi alfa vijačnicami in brez beta strands. Terciarna struktura je globularna brez disulfatnih mostov. Glede na to, da ima SAA1 proteinske interakcije s kolageni, FPRL-1, VIMP (Selenoprotein S) in LAMA1, to nakazuje njegovo vpletenost v morebitno regulacijo pri procesih celjenja ran, vnetja, degradacijskem procesu nepravilno zloženih luminalnih proteinov endoplazemskega retikuluma ter pri regulaciji ekstracelularnega matriksa.

## 7 LITERATURA IN VIRI

[1] About the NCBI RefSeqGene Project, 2013, National Center for Biotechnology Information, USA, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/rsg/about/> (Avgust 2014)

[2] Alfa vijačnica: [http://en.wikipedia.org/wiki/Alpha\\_helix](http://en.wikipedia.org/wiki/Alpha_helix) (Avgust 2014)

[3] J. B. Ancsin in R. Kisilevsky, Characterization of high affinity binding between laminin and the acute-phase protein, serum amyloid A, *The Journal Of Biological Chemistry* 272 (1997), 406-413.

[4] R. Badolato, J. M. Wang, S.-L. Stornello, A. N. Ponzi, M. Duse in T. Musso, Serum amyloid A is an activator of PMN antimicrobial functions: induction of degranulation, phagocytosis, and enhancement of anti-Candida activity, *Journal of Leukocyte Biology* 67 (2000), 381-386.

[5] D. W. A. Buchan, F. Minneci, T. C. O. Nugent, K. Bryson in D. T. Jones, Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench, *Nucleic Acids Research* 41 (2013), W349–W357.

[6] A. Chait, C. Y. Han, J. F. Oram in J. W. Heinecke, Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease?, *Journal of Lipid Research* 46 (2005), 389-403.

[7] L. C. Daugherty, R. L. Seal, M. W. Wright in E. A. Bruford, Gene family matters: expanding the HGNC resource, *Human Genomics* 6 (2012), 1-6.

[8] E. C. Dimmer, R. P. Huntley, Y. Alam-Faruque, T. Sawford, C. O'Donovan, M. J. Martin, B. Bely, P. Browne, W. M. Chan, R. Eberhardt, M. Gardner, K. Laiho, D. Legge, M. Magrane, K. Pichler, D. Poggioli, H. Sehra, A. Auchincloss, K. Axelsen, M.-C. Blatter, E. Boutet, S. Braconi-Quintaje, L. Breuza, A. Bridge, E. Coudert, A. Estreicher, L. Famiglietti, S. Ferro-Rojas, M. Feuermann, A. Gos, N. Gruaz-



Gumowski, U. Hinz, C. Hulo, J. James, S. Jimenez, F. Jungo, G. Keller, P. Lemercier, D. Lieberherr, P. Masson, M. Moinat, I. Pedruzzi, S. Poux, C. Rivoire, B. Roechert, M. Schneider, A. Stutz, S. Sundaram, M. Tognolli, L. Bougueleret, G. Argoud-Puy, I. Cusin, P. Duek-Roggli, I. Xenarios in R. Apweiler, The UniProt-GO Annotation database in 2011, *Nucleic Acids Research* 40 (2012), D565–D570.

[9] O. Emanuelsson, H. Nielsen, S. Brunak in G. von Heijne, Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence, *J. Mol. Biol.* 300 (2000), 1005-1016.

[10] A. Erman, K. Lakota, K. Mrak-Poljsak, M. G. Blango, V. Krizan-Hergouth, M. A. Mulvey, S. Sodin-Semrl in P. Veranic, Uropathogenic *Escherichia coli* Induces Serum Amyloid A in Mice following Urinary Tract and Systemic Inoculation, *PLoS ONE* 7 (2012), 1-7.

[11] C. Gabay in I. Kushner, Acute – phase proteins and other systemic responses to inflammation, *The New England Journal of Medicine* 340 (1999), 448-454.

[12] J. Garnier, J.-F. Gibrat in B. Robson, GOR Method for Predicting Protein Secondary Structure from Amino Acid Sequence, *Methods in Enzymology* 266 (1996), 540-553.

[13] E. Gasteiger, A. Gattiker, C. Hoogland, I. Ivanyi, R. D. Appel in A. Bairoch, ExPASy: the proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis, *Nucleic Acids Research* 31 (2003), 3784–3788.

[14] Glukokortikoidi: <http://it.wikipedia.org/wiki/Glucocorticoide> (Avgust 2014)

[15] A. Hamosh, A. F. Scott, J. S. Amberger, C. A. Bocchini in V. A. McKusick, Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders, *Nucleic Acids Research* 33 (2005), D514–D517.

[16] R. Hari-Dass, C. Shah, D. J. Meyer in J. G. Raynes, Serum Amyloid A Protein

Binds to Outer Membrane Protein A of Gram-negative Bacteria, *The Journal Of Biological Chemistry* 280 (2005), 18562–18567.

[17] T. Hirokawa, S. Boon-Chieng in S. Mitaku, SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins, *Bioinformatics Applications Note* 14 (1998), 378 – 378.

[18] M. Johnson, I. Zaretskaya, Y. Raytselis, Y. Merezuk, S. McGinnis in T. L. Madden, NCBI BLAST: a better web interface, *Nucleic Acids Research* 36 (2008), W5-W9.

[19] M. Kanehisa in S. Goto, KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, *Nucleic Acids Research* 28 (2000), 27-30.

[20] K. Lakota, K. Mrak-Poljsak, B. Rozman in S. Sodin-Semrl, Serum Amyloid A and Its Potential Physiological / Pathological Functions - An Overview of Patents, *Recent Patents on Endocrine, Metabolic & Immune Drug Discovery* 4 (2010), 1-11.

[21] K. Lakota, M. Frank, O. Buzan, M. Tomsic, B. Rozman in S. Sodin-Semrl (2011). Acute Phase Proteins in Prototype Rheumatic Inflammatory Diseases, Acute Phase Proteins - Regulation and Functions of Acute Phase Proteins, Prof. Francisco Veas (Ed.), ISBN: 978-953-307-252-4, InTech, DOI: 10.5772/18350.

[22] M. Lavie, C. Voisset, N. Vu-Dac, V. Zurawski, G. Duverlie, C. Wychowski in J. Dubuisson, Serum Amyloid A Has Antiviral Activity Against Hepatitis C Virus by Inhibiting Virus Entry in a Cell Culture System, *Hepatology* 44 (2006), 1626-1634.

[23] J. Liang, B. M. Schreiber, M. Salmona, G. Phillip, W. A. Gomenan, F. C. de Beer in J.D. Sipel, Amino terminal region of acute phase, but not constitutive, serum amyloid A (apoSAA) specifically binds and transports cholesterol into aortic smooth muscle and HepG2 cells, *Journal of Lipid Research* 37 (1996), 2109-2116.

[24] J. Lu, Y. Yu, I. Zhu, Y. Cheng in P. D. Sun, Structural mechanism of serum

amyloid A-mediated inflammatory amyloidosis, *PNAS* 111 (2014), 5189–5194.

[25] Molecular Biology Review, 2007, National Center for Biotechnology Information, USA, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MOLACourse/Modules/MolBioReview/central\\_dogma.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/MOLACourse/Modules/MolBioReview/central_dogma.html)

[26] G. Pollastri in A. McLysaght, Porter: a new, accurate server for protein secondary structure prediction, *Bioinformatics Applications Note* 21 (2005), 1719-1720.

[27] K. D. Pruitt, T. Tatusova, G. R. Brown in D. R. Maglott, NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy, *Nucleic Acids Research* 40 (2012), D130-135.

[28] Random coil: [http://en.wikipedia.org/wiki/Random\\_coil](http://en.wikipedia.org/wiki/Random_coil) (Avgust 2014)

[29] C. Rojas-Cartagena, P. Ortíz-Pineda, F. Ramírez-Gómez, E. C. Suárez-Castillo, V. Matos-Cruz, C. Rodríguez, H. Ortíz-Zuazaga in J. E. García-Arrarás, Distinct profiles of expressed sequence tags during intestinal regeneration in the sea cucumber *Holothuria glaberrima*, *Physiol Genomics* 31 (2007) 203-215.

[30] M. Safran, I. Dalah, J. Alexander, N. Rosen, T. I. Stein, M. Shmoish, N. Nativ, I. Bahir, T. Doniger, H. Krug, A. Sirota-Madi, T. Olender, Y. Golan, G. Stelzer, A. Harel in D. Lancet, GeneCards Version 3: the human gene integrator, *Database update* (2010), 1-16.

[31] P. Santiago, J. L. Roig-López, C. Santiago, in J. E. García-Aarrarás, Serum Amyloid A Protein in an Echinoderm: Its Primary Structure and Expression During Intestinal Regeneration in the Sea Cucumber *Holothuria glaberrima*, *Journal of experimental zoology* (Mol. Dev. Evol.) 288 (2000) 335-344.

[32] E. W. Sayers, T. Barrett, D. A. Benson, E. Bolton, S. H. Bryant, K. Canese, V. Chetvernin, D. M. Church, M. DiCuccio, S. Federhen, M. Feolo, I. M. Fingerman, L.

Y. Geer, W. Helmberg, Y. Kapustin, S. Krasnov, D. Landsman, D. J. Lipman, Z. Lu, T. L. Madden, T. Madej, D. R. Maglott, A. Marchler-Bauer, V. Miller, I. Karsch-Mizrachi, J. Ostell, A. Panchenko, L. Phan, K. D. Pruitt, G. D. Schuler, E. Sequeira, S. T. Sherry, M. Shumway, K. Sirotkin, D. Slotta, A. Souvorov, G. Starchenko, T. A. Tatusova, L. Wagner, Y. Wang, W. J. Wilbur, E. Yaschenko in J. Ye, Database resources of the National Center for Biotechnology Information, *Nucleic Acids Research* 40 (2012) D13-D25.

[33] Sekretorni protein: [http://en.wikipedia.org/wiki/Secretory\\_protein](http://en.wikipedia.org/wiki/Secretory_protein) (Avgust 2014)

[34] C. Shah, R. Hari-Dass in J. G. Raynes, Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria, *Blood* 108 (2006), 1751-1757.

[35] A. Steinkasserer, E. H. Weiss, W. Schwaeble in R. P. Linke, Heterogeneity of human serum amyloid A protein Five different variants from one individual demonstrated by cDNA sequence analysis, *Biochem. J.* 268 (1990), 187-193.

[36] F. J. Stevens, Hypothetical structure of human serum amyloid A protein, *Amyloid* 11 (2004), 71-80.

[37] S. B. Su, W. Gong, J.-L. Gao, W. Shen, P. M. Murphy, J. J. Oppenheim in J. M. Wang, A Seven-transmembrane, G Protein-coupled Receptor, FPRL1, Mediates the Chemotactic Activity of Serum Amyloid A for Human Phagocytic Cells, *The Journal of Experimental Medicine* 189 (1999), 395-402.

[38] C. F. Thorn, Z.-Y. Lu in A. S. Whitehead, Regulation of the Human Acute Phase Serum Amyloid A Genes by Tumour Necrosis Factor- $\alpha$ , Interleukin-6 and Glucocorticoids in Hepatic and Epithelial Cell Lines, *Scandinavian Journal of Immunology* 59 (2004), 152-158.

[39] Transmembranski protein:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Transmembrane\\_protein#Stability\\_of\\_.CE.B1-helical\\_transmembrane\\_proteins](http://en.wikipedia.org/wiki/Transmembrane_protein#Stability_of_.CE.B1-helical_transmembrane_proteins) (Avgust 2014)

[40] C. M. Uhlar in A. S. Whitehead, Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant, *Eur. J. Biochem.* 265 (1999), 501-523.

[41] K. Walder, L. Kantham, J. S. McMillan, J. Trevaskis, L. Kerr, A. de Silva, T. Sunderland, N. Godde, Y. Gao, N. Bishara, K. Windmill, J. Tenne-Brown, G. Augert, P. Z. Zimmet in G. R. Collier, Tanis: a link between type 2 diabetes and inflammation?, *Diabetes* 51 (2002), 1859-1866.

[42] M. Zvilin, U. Kochva in I. T. Arkin, How important are transmembrane helices of bitopic membrane proteins? *Biochimica et Biophysica Acta* 1768 (2007) 387–392.